

THESE

présentée devant la Faculté de Pharmacie de Nancy
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Doctorat d'Etat)
par

Claude VIGNERON

Pharmacien

Ancien Interne des Hôpitaux de Nancy

Lauréat de l'Université et des Hôpitaux de Nancy

Titulaire des Certificats d'Etudes Supérieures de Biochimie Générale et de Biochimie Appliquée
des Certificats d'Etudes Spéciales de Biochimie Pharmaceutique et Technique
Hématologie, Immunologie Générale et Appliquée

Assistant, Délégué Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie de Nancy

Attaché au Centre Régional de Transfusion Sanguine et d'Hématologie de Nancy

Né le 22 Août 1941, à Laxou (54)

**CONTRIBUTION A L'EXPLORATION BIOCHIMIQUE
DES ERYTHROENZYMOPATHIES**

SOUTENUE LE 1^{er} JUILLET 1970, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Examineurs de la Thèse

M. le Doyen

R. BENE

Président

M. le Professeur

A. MEUNIER

Juges

M. le Professeur

M. PIERFITTE

M. le Professeur Agrégé

F. STREIFF

Adjoint au Jury

Directeur du Centre Régional de Transfusion
Sanguine et d'Hématologie de Nancy

THESE

présentée devant la Faculté de Pharmacie de Nancy
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Doctorat d'Etat)
par

Claude VIGNERON

Pharmacien

Ancien Interne des Hôpitaux de Nancy

Lauréat de l'Université et des Hôpitaux de Nancy

Titulaire des Certificats d'Etudes Supérieures de Biochimie Générale et de Biochimie Appliquée
des Certificats d'Etudes Spéciales de Biochimie Pharmaceutique et Technique

Hématologie, Immunologie Générale et Appliquée

Assistant, Délégué Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie de Nancy

Attaché au Centre Régional de Transfusion Sanguine et d'Hématologie de Nancy

Né le 22 Août 1941, à Laxou (54)

**CONTRIBUTION A L'EXPLORATION BIOCHIMIQUE
DES ERYTHROENZYMOPATHIES**

SOUTENUE LE 1er JUILLET 1970, DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

Examineurs de la Thèse

M. le Doyen

R. BENE

Président

M. le Professeur

A. MEUNIER

Juges

M. le Professeur

M. PIERFITTE

M. le Professeur Agrégé

F. STREIFF

Adjoint au Jury

Directeur du Centre Régional de Transfusion
Sanguine et d'Hématologie de Nancy



UNIVERSITE DE NANCY

FACULTE DE PHARMACIE

Personnel Enseignant

Professeurs

M.	MEUNIER A.	Pharmacie Galénique
Mle	FRANCOIS M.-Th.	Matière Médicale
MM.	MARCHAL J.G.	Microbiologie
	STEIMETZ E.	Sciences Naturelles
	SOLEIL J.	Pharmacie Chimique
	BERNANOSE A.	Physique
Mle	BESSON S.	Pharmacodynamie
MM.	BENE R.	Sciences Biologiques (Zoologie, Biologie, Parasitologie, Hématologie)
	MIRJOLET M.	Chimie Analytique et Toxicologie
	PIERFITTE M.	Chimie Biologique
	PELT J.M.	Biologie Végétale et Cryptogamie

Professeur sans chaire

M.	MARTIN J.A.	Chimie Minérale et Minéralogie
----	-------------	--------------------------------

Maîtres de Conférences Agrégés

Mle	GIRARD M.-Th.	Hygiène
MM.	HAYON J.C.	Matière Médicale et Botanique
	JOUANY J.M.	Toxicologie
	SCHWARTZBROD L.	Microbiologie
	SIEST G.	Chimie Biologique

Maîtres de Conférences Délégués

MM.	BONALY R.	Chimie Biologique
	LOPPINET V.	Chimie Organique

Maîtres-Assistants

Mme	LASSEUR A.	Microbiologie
MM.	BAUDOT P.	Chimie Analytique Qualitative
	DIXNEUF P.	Physique
	HOFFMAN M.	Pharmacie Galénique
Mle	ROOS F.	Biochimie

Chefs de Travaux Pratiques

M. AIMOND P.	Chimie Analytique Quantitative
Mme BALDO S.	T.P. Microbiologie C.E.S.
Mle BARRET F.	Zoologie
MM. JACQUE M.	Pharmacodynamie
LECTARD P.	Micrographie
Mme DILIGENT	Chimie Biologique
M. VIGNERON C.	Sciences Pharmaceutiques
Mle GIRARD M.-Th.	Secourisme

Doyens honoraires : M. RICHARD, Recteur de l'Académie de TOULOUSE
M. BERNANOSE, Faculté de Pharmacie - NANCY

Professeurs Honoraires : M. CORDEBARD H. - M. FRANQUET R.

Maître de Conférences Honoraire : M. ANZIANI P.

Chargés de Cours Complémentaires

MM. MARCHAL J.G.	C.E.S. Immunologie
STEIMETZ E.	Mycologie, Microchimie
Mle BESSON S.	C.E.S. Pharmacodynamie et essais biologiques des médicaments
MM. MIRJOLET M.	C.E.S. Chimie Biologique, méthodes physiques et chimiques d'analyse
PIERFITTE M.	C.E.S. Chimie Biologique
PELT J.M.	C.E.S. Mycologie
MARTIN J.A.	Travaux dirigés de Chimie Générale et Minérale
Mle GIRARD M.-Th.	C.E.S. Mycologie, Hydrologie, Hydrologie Thermale
M. HAYON J.C.	C.E.S. Mycologie
M. JOUANY J.M.	Toxicologie, Hydrologie, Hydrologie Thermale
M. SCHWARTZBROD L.	C.E.S. Immunologie
Mme LASSEUR A.	C.E.S. Immunologie
MM. HOFFMAN M.	Pharmacie galénique industrielle
ANZIANI P.	Synthèse organique
BOYER P.	Notions de mathématiques appliquées aux Sciences expérimentales - Physique
MM. CALAMAI	Eléments de Séméiologie et de Pathologie générale
LARCAN A.	Eléments de Séméiologie et de Pathologie générale
COINUS	Gestion et Comptabilité
DIVOUX	Reconnaissances de Pharmacie Chimique et Galénique
GAUDRON	Pharmacie Galénique (Conférences)
GREGOIRE	Législation - Législation Pharmaceutique et Sociale
MM. HACHET	
LASSEUR Ph.	Organisation Scientifique du Travail et Gestion Pharmaceutique industrielle
OVION	
BEUREY	C.E.S. Mycologie
KREEL	Génie Pharmaceutique
MEYER	Gestion et Comptabilité

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver, ni les imputer.

A MES PARENTS,

En témoignage de mon affection.

A MES AMIS,

A NOTRE PRESIDENT DE THESE,

Monsieur le Professeur R. BENE
Professeur de Sciences Biologiques
Doyen de la Faculté de Pharmacie

Nous le remercions d'avoir accepté la présidence de ce Jury.
Il a bien voulu nous aider par ses conseils dans l'élaboration de
ce travail et nous a accordé sa confiance en nous demandant d'as-
surer l'enseignement de l'Hématologie.
Qu'il trouve ici l'expression de notre très sincère gratitude et
de notre profond respect.

A NOS JUGES,

Monsieur le Professeur A. MEUNIER
Professeur de Pharmacie Galénique,
Ancien Pharmacien-Chef des Hôpitaux de Nancy

Il nous a fait le très grand honneur de bien vouloir siéger dans
notre Jury de thèse.

Son érudition et sa modestie sont pour nous un exemple.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre profond
respect et de notre admiration.

Monsieur le Professeur M. PIERFITTE
Professeur de Chimie Biologique

Nous le prions de trouver ici l'expression de notre très respectueuse
gratitude pour la bienveillance qu'il nous a toujours témoi-
gnée et pour le soin particulier avec lequel il a suivi la rédac-
tion de notre travail.

Monsieur le Professeur F. STREIFF
Professeur Agrégé d'Hématologie à la Faculté de Médecine
Directeur du Centre Régional de Transfusion Sanguine et d'Hématologie

Il nous a accueilli avec une extrême bienveillance au Centre de
Transfusion, où il nous a donné les moyens de réaliser nos recherches.
Sa brillante personnalité, la rigueur de son raisonnement, son
efficacité, nous séduisent quotidiennement.

Nous lui exprimons notre reconnaissance pour la confiance dont il
nous honore et l'assurons de notre dévouement.

A NOS MAITRES A LA FACULTE DE PHARMACIE ET DANS LES HOPITAUX,

En hommage respectueux.

AUX INTERNES EN PHARMACIE DES HOPITAUX DE NANCY

En gage d'amitié.

Que tous ceux qui nous ont aidé à réaliser ce travail trouvent ici l'expression de notre sincère reconnaissance, sans oublier le personnel du Laboratoire de Chimie Hématologique du Centre de Transfusion.

"Il n'existe pas de bons biologistes dont la vocation ne soit née d'une joie profonde devant les beautés de la nature vivante".

Konrad LORENZ

INTRODUCTION

"Les cellules de notre cerveau ne se renouvellent pas comme celles de notre peau ou de notre sang. Nous sommes condamnés à garder en nous toute la vie les mêmes éléments qu'ont affecté certains malheurs".

Il est tentant de transposer ces lignes écrites par Jean ROSTAND (325) au domaine des erreurs innées du métabolisme et pour nous, au cas particulier des érythroenzymopathies : une déficience enzymatique congénitale n'est-elle pas également immuable et n'oblige-t-elle pas le porteur à vivre ou à survivre avec elle ?

On peut considérer que l'enzymologie pathologique est née en 1908 lorsque GARROD a supposé qu'une déficience enzymatique transmise génétiquement était responsable de l'alcaptonurie. Aujourd'hui, l'enzymologie n'est plus le domaine réservé d'une science. Sans elle, il n'est plus concevable d'aborder l'étude des activités cellulaires, des processus métaboliques, de la perméabilité des membranes, de la coagulation sanguine, de l'absorption et de l'excrétion, bref des fonctions les plus diverses de l'organisme.

L'origine du chapitre des érythroenzymopathies, domaine nouveau de l'hématologie, est néanmoins récente. Il n'y a guère qu'une quinzaine d'années, grâce en particulier aux travaux de BEUTLER (27) que l'on réalisa que l'hématie pouvait se révéler utile au diagnostic des maladies alors que WARBURG avait depuis longtemps reconnu le globule rouge comme l'élément le mieux adapté à l'étude des processus métaboliques chez les animaux supérieurs. Très accessible, il peut être étudié dans des conditions expérimentales voisines de son état physiologique.

Ce sont les progrès récents de la biochimie qui, rapprochés de con-

naissances cliniques plus anciennes - la première description d'une anémie congénitale non sphérocytaire par WIDAL et RAVAUULT remonte à 1902 -, permirent de définir les érythroenzymopathies comme un chapitre de l'hématologie, au même titre que les hémoglobinopathies.

La première identification d'une anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire de nature enzymopénique a été rapportée par CARSON en 1956 (83 - 84 - 85). A cette époque, il fut reconnu qu'un déficit de l'hématie en glucose-6-phosphate déshydrogénase était responsable de l'hémolyse déclenchée chez certains sujets de race noire après absorption de médicaments antipaludéens.

Presque simultanément, il fut démontré que la galactosémie était due à un déficit de l'enzyme galactose-1-phosphate uridylyltransférase, et bien que ce désordre n'ait pas de traduction hématologique, le globule rouge se montra comme un miroir fidèle du déficit hépatique. Puisque plus accessible, il est devenu l'outil standard du diagnostic de la galactosémie.

Faisant suite à ces découvertes, et à mesure que le domaine des recherches s'étend et que les examens se multiplient, un nombre croissant d'érythroenzymopathies apparaît. Une quinzaine de déficits différents sont actuellement répertoriés, certains d'entre-eux comptant déjà de nombreuses variantes qualitatives démontrant leur polymorphisme.

Les anomalies décrites intéressent pour la plupart les deux grandes voies métaboliques du globule rouge et se manifestent le plus souvent par une hyperhémolyse permanente ou déclenchée par la prise de substances toxiques ou médicamenteuses.

L'étude biochimique s'avère seule capable d'étiqueter un déficit de façon formelle.

La qualité des méthodes d'exploration est donc fondamentale. Depuis quinze ans, l'étude des érythroenzymopathies a traversé plusieurs étapes technologiques.

La première fut tout entière consacrée à la découverte de moyens de dépistage directs ou non ; elle mena logiquement, dans un deuxième temps, à la mesure spécifique de l'activité enzymatique c'est-à-dire à l'appréciation quantitative du déficit.

Nous abordons désormais, sans pouvoir l'approfondir totalement par défaut de techniques appropriées, l'étude qualitative fine des déficits découverts.

A ce jour, on peut raisonnablement penser que l'enzymologie est encore trop souvent considérée sous son seul aspect clinique. Certes elle apporte au clinicien des éléments diagnostiques parfois irremplaçables, et cette contribution ira croissant, mais l'importance théorique de l'enzymologie pathologique nous paraît beaucoup plus grande encore. Bien des questions restent posées.

Le lien entre le déficit et l'hémolyse, le mode de transmission restent souvent incertains ou totalement inconnus. Et, vu sous l'angle de la pathologie moléculaire, il est encore rarement précisé si le déficit résulte de l'absence de synthèse de la molécule normale ou si une modification structurale rend cette molécule inactive, ou bien encore si le déficit n'est que la conséquence d'une autre affection (mise en oeuvre de systèmes d'inhibition ou d'activation). Dès à présent, les résultats obtenus démontrent que les trois possibilités existent et on peut déjà supposer que la connaissance approfondie des mécanismes intimes de chaque défi-

cit pourra se révéler bénéfique.

Pour preuve, il n'est que de citer l'histoire toute récente du déficit en glutathion réductase qui apparaît désormais comme une affection acquise résultant d'un trouble primaire au niveau du flavine-adénine-dinucleotide (31 - 33)

Comme on le voit, les deux aspects théorique et pratique ne sauraient être facilement dissociés dans l'exploration des érythroenzymopathies : c'est dans cet esprit qu'a été conçu le présent travail.

Il a été réalisé dans le cadre de notre activité biologique au Centre Régional de Transfusion Sanguine et d'Hématologie (Professeur F. STREIFF) où dans le but initial de contribuer à l'exploration biochimique des anémies hémolytiques non sphérocytaires, nous avons dû envisager à partir de 1965 la création d'un département d'enzymologie.

Nos recherches, d'abord strictement limitées à l'étude des enzymes, coenzymes et substrats des deux grandes voies du métabolisme glucidique de l'hématie, se sont tout naturellement étendues aux enzymes érythrocytaires dans leur ensemble, puis aux enzymes des éléments figurés du sang. Notre expérience porte aujourd'hui sur quelques 300 bilans enzymatiques.

Notre travail se trouve divisé en deux parties.

La première exclusivement bibliographique, comprend deux chapîtres. Le premier rappelle brièvement le métabolisme du globule rouge, tandis que le second, que nous avons voulu très développé, fait le point des connaissances actuelles des propriétés et du déficit éventuel de chaque enzyme.

La deuxième partie, rassemblant cinq chapîtres, fait la relation de notre expérience et de nos recherches.

Le chapitre I expose les méthodes d'exploration des érythroenzymopathies. Leur utilisation journalière depuis cinq années nous autorise à en faire l'étude critique et à proposer les éléments d'un bilan type.

Le chapitre II propose de nouvelles méthodes d'étude de la galactokinase érythrocytaire. Il apporte ainsi une contribution à l'exploration biochimique d'une érythroenzymopathie récemment mise à jour (151) et trop peu souvent envisagée.

Le chapitre III s'intéresse aux activités enzymatiques du sang du cordon car en raison de la nature congénitale des anémies hémolytiques non sphérocytaires, une grande partie des bilans intéresse les nourrissons et les très jeunes enfants.

Une situation semblable avait amené COTTE et Coll. (108) à réaliser une série de mesures sur des enfants prématurés, des nouveaux-nés et des nourrissons normaux, dans le but d'établir des valeurs normales nécessaires à l'interprétation correcte des résultats ; nous savons en effet que certaines activités enzymatiques du jeune enfant diffèrent nettement des valeurs adultes (diaphorase NADH dépendante abaissée, galactokinase augmentée, etc...). Pour notre part, nous avons pensé que l'approche des valeurs des activités enzymatiques des hématies du nouveau-né pourrait peut-être trouver un appoint dans la mesure des enzymes du sang du cordon, admettant dans cette hypothèse la parfaite identité entre le sang du cordon et celui du nouveau-né.

Les résultats très particuliers obtenus, difficilement explicables à notre sens par la seule présence d'une forte proportion d'hématies jeunes, nous ont conduit à entreprendre l'étude approfondie des caractères physico-chimiques des enzymes du sang du cordon.

Nous avons choisi pour cela d'étudier la G-6PD, enzyme dont les propriétés sont les mieux connues.

Le chapitre IV relate l'étude biochimique de quelques déficits enzymatiques ; ne sont rapportés dans ce chapitre parmi les déficits mis à jour, que ceux qui présentent un caractère d'originalité, soit par leur aspect nouveau, soit par l'étude particulière que nous avons entreprise.

Le chapitre V, né de la présence simultanée d'un département de cytogénétique et d'un département d'enzymologie au Centre Régional de Transfusion, compare avec les rares données de la littérature, et avec toute la réserve nécessaire, les résultats des bilans enzymatiques réalisés chez quelques malades porteurs d'anomalies chromosomiques dans un but de localisation des gènes structuraux des enzymes sur les chromosomes.

INTRODUCTION

A propos du genre du mot enzyme

PREMIERE PARTIE

Etude bibliographique

CHAPITRE I : Le métabolisme du globule rouge.

CHAPITRE II: Les enzymes du globule rouge.

DEUXIEME PARTIE

Etude expérimentale

CHAPITRE I : Exploration des érythroenzymopathies

CHAPITRE II : Nouvelles méthodes d'étude de la galactokinase

CHAPITRE III : Activités enzymatiques du sang du cordon.
Particularités de la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

CHAPITRE IV : Etude biochimique de quelques déficits enzymatiques.

- A - Anémie hémolytique chronique par déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase chez un Européen.
Mise en évidence d'une variante nouvelle de l'enzyme.
- B - Méthémoglobinémie congénitale par déficit en diaphorase NADH dépendante chez deux soeurs.
- C - Déficit partiel et transitoire en galactokinase érythrocytaire chez un nouveau-né.

CHAPITRE V : Enzymes érythrocytaires et aberrations chromosomiques.

CONCLUSION

A PROPOS DU GENRE DU MOT ENZYME

Masculin ou féminin, c'est précisément une question de genre que soulève l'emploi du mot enzyme.

Créé en 1877 par l'Allemand Walter KÜHNE d'après le grec $\epsilon\nu$ (dans) - ζυμη (levain), ce néologisme eut quelque peine à se faire accepter des spécialistes qui jusque vers 1925, lui préférèrent ferment et surtout diastase.

Quand le mot fut adopté, il fallut lui attribuer un genre grammatical.

Les premiers biologistes l'avaient fait féminin, mais sous l'influence de l'article allemand "das" et de l'article anglais indifférencié "the" beaucoup l'employèrent au masculin.

En 1957, un linguiste se fondant d'une part sur l'étymologie grecque et, d'autre part sur l'analogie d'enzyme avec diastase et le terme général substance, tous les deux féminins, concluait en faveur du genre féminin.

La commission du langage scientifique se rangea à l'avis du linguiste, mais une pétition de savants partisans du masculin remit tout en question à tel point que le Comité National de Biochimie décida en 1962 que le mot pouvait s'employer indifféremment au masculin ou au féminin.

Quant aux dictionnaires, ils ne parvenaient pas à s'entendre, les uns faisant le mot masculin, les autres le déclarant féminin, d'autres enfin donnant les deux genres.

Le 5 février 1970, l'Académie Française s'est prononcée en faveur du féminin après consultation des Académies des Sciences et de Médecine.

Ainsi prenait fin officiellement une longue querelle qui a divisé le monde des biologistes.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADP	Adénosine diphosphate
Aldo	Aldolase
AMP	Adénosine monophosphate
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Adénosine triphosphatase
BMB	Bain-marie bouillant
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
D O	Densité optique
1,3-DPG	1,3-diphosphoglycérate
2,3-DPG	2,3-diphosphoglycérate
DPGM	2,3-diphosphoglycéro mutase
EDTA	Ethylène diamine tétra acétique
Eno	Enolase
FAD	Flavine adénine dinucléotide
F-1,6-DP	Fructose,1,6-diphosphate
F-1-P	Fructose-1-phosphate
F-6-P	Fructose-6-phosphate
Gal	Galactose
GAP	D-Glycéraldéhyde-3-phosphate
G-1-6-DP	Glucose-1-6-diphosphate
Glu	Glucose
GPD	Glycéro-phosphate-déshydrogénase
G-1-P	Glucose-1-phosphate
G-6-P	Glucose-6-phosphate
G-6PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GS-SG	Glutathion oxydé
HK	Hexokinase
Lact	Lactate
LDH	Lactico-déshydrogénase
mn	minute

mM	Millimole
NAD	Nicotinamide adénine diphosphopyridine
NADH	Nicotinamide adénine diphosphopyridine réduit
NADP	Nicotinamide adénine triphosphopyridine
NADPH	Nicotinamide adénine triphosphopyridine réduit
nm	Nanomètre = $m\mu$ = $10^9 \text{ \AA}$
PEP	Phosphoénol pyruvate
PFK	Phosphofructokinase
3-PG	3-phosphoglycérate
6-PG	6-phosphogluconate
6-PGD	6-phosphogluconate déshydrogénase
PGK	Phosphoglycérate kinase
PHI	Phosphohexoisomérase
PHM	Phosphohexomutase
PK	Pyruvate kinase
Pyr	Pyruvate
TEA	Triéthanolamine
TPI	Triose phosphate isomérase
UDPG	Uridine diphospho glucose
UDP Gal	Uridine diphospho galactose
U.I.	Unité Internationale
μM	Micro mole

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

C H A P I T R E I - LE METABOLISME DU GLOBULE ROUGE

Il y a quelque vingt ans, le globule rouge était encore considéré comme une poche inerte, emplie d'hémoglobine, destinée à suivre la circulation pendant près de quatre mois avant d'être hémolysée contre la paroi d'un vaisseau sanguin. A présent, il est loin de répondre à cette définition.

L'absence de noyau lui confère un caractère cytologique original; du point de vue physiologique, il se présente comme un élément cellulaire hautement différencié dont la fonction essentielle est le transport de l'oxygène moléculaire des alvéoles pulmonaires aux tissus : "livreurs fidèles de l'oxygène aux tissus, les globules rouges ne détournent pas à leur usage le dépôt qui leur est confié" (301).

Quant à sa structure, l'érythrocyte se compose de trois unités fonctionnelles fondamentales : l'hémoglobine, la membrane cellulaire, les éléments solubles intraglobulaires.

A ces divers titres, le globule rouge s'il n'apparaît pas vraiment différent des autres cellules de l'organisme en présente une image simplifiée : incapable de réaliser la synthèse des porphyrines, des protéines, des acides nucléiques et certainement des lipides, dépourvu de noyau et de mitochondries, diminué de la plupart des enzymes du cycle tricarboxylique et de certains éléments des chaînes de transporteur d'électrons, il va cependant vivre 120 jours préservant son intégrité cellulaire et protégeant sous sa forme réduite l'hémoglobine qu'il transporte.

Il est clair que pour mener à bien cette vie, l'hématie a un besoin constant d'énergie, nécessaire aux impératifs suivants :

- 1) Maintenir l'hémoglobine sous forme réduite.

2) Préserver l'homéostasie de la concentration ionique : le sodium qui pénètre la cellule doit en être évacué activement, tandis que le potassium y est introduit malgré un gradient électrochimique considérable.

3) Conserver à la cellule sa forme biconcave.

Les voies du métabolisme dans l'hématie sont, en quelque sorte, identiques à celles des autres tissus, mais contrairement à la plupart des autres cellules, elle ne renferme pas de mitochondries et n'est donc pas le siège d'un cycle tricarboxylique de Krebs.

Cela ne surprend pas ; il est fréquent que les éléments cytologiques de tissus distincts présentent des équipements enzymatiques différents. L'activité des chaînes métaboliques, variable d'un tissu à l'autre, s'adapte ainsi à la fonction physiologique.

Pour leur part, les cellules de la lignée rouge, du proérythroblaste de la moelle osseuse jusqu'à l'hématie mature du sang périphérique, fournissent au fur et à mesure de leur différenciation, marquée par des caractères cytologiques et cytochimiques nets, un bel exemple de la variation des capacités métaboliques : des activités enzymatiques s'estompent et disparaissent.

Selon HARRIS (166), si les éléments nucléés possèdent l'aptitude à se diviser, synthétisent les acides nucléiques, les protéines, les lipides, contiennent les éléments du cycle de Krebs et des voies métaboliques d'Emmerson-Meyerhof et des pentoses-phosphates, c'est-à-dire un équipement complet, il n'en est déjà plus de même du réticulocyte. Ce dernier n'est plus capable ni de se diviser, ni de synthétiser les acides nucléiques.

Quant à l'hématie adulte, seules les voies d'Emmerson-Meyerhof et des pentoses-phosphates y subsistent.

	Erythroblastes	Réticulocytes	Erythrocytes
Synthèse de l'ADN	+	0	0
Synthèse de l'ARN	+	+	0
Synthèse des protéines	+	+	0
Synthèse des lipides	+	+	+
Synthèse de l'hème	+	+	0
Synthèse des nucléotides	+	+	+
Glycolyse anaérobie	+	+	+
Voie des pentoses	+	+	+
Cycle de Krebs	+	+	0
Synthèse du cytochrome	+	+	0

TABLEAU 1 : Modifications biochimiques au cours de la maturation du globule rouge selon HARRIS (166)

Témoins n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Glucose	1,44	1,58	1,31	1,07	1,29	1,36	1,07	1,58	1,36	1,42
Galactose	0,17	0,25	0,26	0,17	0,21	0,30	0,16	0,29	0,20	0,21

TABLEAU 2 : Consommation du glucose et du galactose in vitro en μ moles/heure/ml GR (témoins adultes)

Les activités de synthèse, retrouvées à l'état de vestiges, ne sont que des reliquats du stade réticulocytaire.

L'énergie nécessaire aux fonctions de la cellule adulte est dispensée à l'hématie par la seule dégradation anaérobie du glucose par la voie glycolytique d'Emden-Meyerhof, et par le shunt des hexoses monophosphates, dont enzymes et substrats sont localisés dans le cytoplasme.

Or, les besoins biochimiques du globule rouge sont justement d'une part l'ATP (transport actif des cations, et maintien de la forme), d'autre part, le NADH (réduction de l'hémoglobine). Ceci revient à dire que la cellule est particulièrement bien adaptée à ses fonctions.

Un tel degré de perfectionnement dans la spécialisation conduit à penser qu'une vie de 120 jours est paradoxalement courte pour un outil si bien ciselé ; il contribue aussi à mieux comprendre qu'une lésion si légère soit-elle rend la cellule fragile.

A. - L'INCORPORATION DES OSES PLASMATIQUES.

La perméabilité aux oses est une propriété générale de la membrane cellulaire que l'érythrocyte partage avec beaucoup d'autres cellules.

Dans les conditions physiologiques, le glucose est la source d'énergie du globule rouge. Chez l'homme, le taux du glucose intraglobulaire égale celui du glucose plasmatique et l'équilibre des deux milieux s'établit rapidement.

La structure membranaire joue un rôle essentiel dans la perméabilité ; il a été montré que des stromas globulaires dépourvus de tout matériel intracellulaire continuent à incorporer les oses avec les mêmes caractéristiques que la cellule intacte (374).

Le stroma montre une structure particulière : les phospholipides, le cholestérol et les glycolipides constituent la membrane ; ils sont maintenus en place, soudés entre eux par des protéines fibrillaires qui soutiennent les groupements mucopolysaccharides portant la spécificité des substances de groupes sanguins.

On admet que la structure de la membrane est celle d'une double assise lipidique dans laquelle les molécules se font face pour leur pôle hydrophobe (21 - 276 - 302 - 380 - 406).

La comparaison entre les propriétés mécaniques de la membrane érythrocytaire et d'une membrane lipidique artificielle semble montrer qu'elle doit être complétée par une double assise de protéines à sa face interne (Fig. 1).

Au microscope électronique, la membrane apparaît comme percée de pores.

Notons que quelques activités enzymatiques sont liées au stroma, en particulier une ATPase active dans le transport des ions sodium et potassium. D'autres enzymes, comme l'acétylcholinestérase, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, la phosphoglycérate kinase, l'adénylate kinase (317) sont aussi présentes dans la membrane, mais leur rôle demeure obscur (maintien de la structure ou participation aux échanges).

La pénétration du glucose utilise des mécanismes qui répondent aux critères d'une diffusion facilitée - et il est, par ailleurs, démontré que le métabolisme glucidique intracellulaire ne règle pas le transfert des oses.

Cette opération implique dans la membrane l'existence d'un site réactif avec lequel le sucre formerait une réaction transitoire qui permet son passage. Pour les aldopyranoses, LEFEVRE a mis en évidence une nette corrélation entre l'affinité pour le site transporteur et la stabilité relative du sucre en configuration C_1 (374).

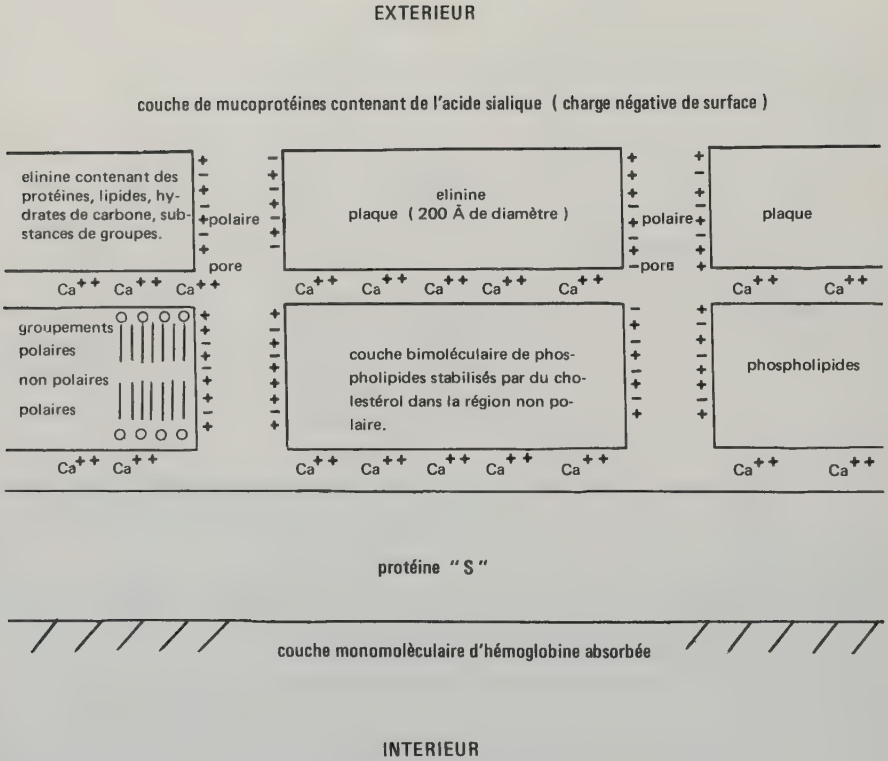


Figure 1 : La structure de la membrane érythrocytaire

Plusieurs règles concernant la vitesse d'entrée du glucose ont pu être définies (87) :

- Elle ralentit lorsque la concentration de glucose croît dans le milieu extérieur et n'est pas proportionnelle au gradient de concentration.
- Elle est modifiée par la présence simultanée d'un autre ose.
- Elle peut être inhibée par des substances diverses.

Si le glucose constitue la source d'énergie presque exclusive du globule rouge, ce dernier se montre également capable de métaboliser d'autres hexoses tels que mannose, fructose et surtout galactose. L'incorporation de ce dernier est primordiale dans la vie de l'hématie du nouveau-né.

Les mesures de l'activité glycolytique et de l'activité galactolytique, examens relativement aisés dans leur réalisation, illustrent bien l'absorption globale des oses.

Dans les conditions décrites par CARTIER (87), la consommation de glucose est de $1,40 \pm 0,23 \mu$ moles par heure par ml de globules rouges. Utilisant la même technique, mais un système d'agitation différent (plateau agitateur à bascule destiné à l'homogénéisation des prélèvements et maintenu à l'étuve à 37°C), nous avons obtenu des résultats semblables ; les mêmes modalités appliquées à la mesure de la consommation du galactose in vitro montrent une affinité environ cinq à dix fois moindre pour cet ose (Tableau 2).

B. - LES VOIES DU CATABOLISME GLUCIDIQUE.

Le phénomène général de la dégradation des glucides dans les tissus a été dénommé glycolyse en 1909 par LEPINE, puis limité à la scission du glucose en acide lactique par WARBURG en 1923.

Aujourd'hui, les voies métaboliques du globule rouge sont devenues des données très classiques et ont fait l'objet de nombreuses mises au point récentes. Nous les rappellerons brièvement sous forme de schémas en insis-

tant sur les aspects du métabolisme plus particuliers à l'hématie.

Un fait fondamental domine toute la physiologie du globule rouge. Comparée avec les autres tissus, l'activité glycolytique du globule rouge est dix à cent fois plus faible; elle est toutefois suffisante pour une cellule qui ne se reproduit pas et dont l'activité de synthèse est presque nulle.

Schématiquement, l'hématie doit faire face à un double problème pour survivre :

- accumuler de l'énergie sous forme d'ATP
- maintenir le potentiel réducteur à un niveau élevé.

Dans le globule rouge, la glycolyse suit un processus anaérobie dont l'étape finale se traduit par la formation de lactate. Mais il se forme moins d'acide lactique qu'il ne se consomme de glucose, ce qui indique qu'en plus de la glycolyse anaérobie par la voie d'Embden-Meyerhof, il existe une seconde voie, la voie oxydative des pentoses-phosphates.

La part qui revient à chacune de ces voies est actuellement assez bien définie.

1. - LA VOIE D'EMBDEN-MEYERHOF (Fig 2)

Selon les travaux de BIRD, la quantité d'acide lactique formé à partir du glucose correspond à 93,7 %. Plus récemment, en utilisant du glucose marqué (14 C_1 - glucose), MURPHY en a chiffré l'activité à 92 % (228).

- Formation d'ATP.

On sait qu'une cellule vivante, capable de métaboliser le glucose et pourvue de tous les enzymes du cycle tricarboxylique, peut effectuer la synthèse de trente-huit liaisons riches à partir d'une molécule de glucose.

Ce bilan est nettement plus modeste dans l'hématie.

Pour chaque molécule de glucose, deux molécules d'ATP sont consommées au cours des réactions d'amorçage, l'une pour la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate par l'hexokinase, l'autre pour la phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose diphosphate par la phosphofructokinase.

Au contraire, deux ATP sont récupérés au cours de l'oxydation phosphorylante des deux trioses-phosphates et deux autres liaisons riches sont biosynthétisées au cours des réactions catalysées par l'énolase et la pyruvate kinase.

Il résulte de ces opérations successives un gain final de deux molécules d'ATP par molécule de glucose consommée.

Ces deux molécules devront suffire à couvrir les besoins énergétiques de la cellule. Leur importance est essentielle dans l'économie cellulaire ; en effet, la concentration d'ATP fléchit dans l'hématie vieillissante.

- Formation de NADH.

Sous l'action de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, le glycéraldéhyde-3-phosphate est transformé en 1,3-diphosphoglycérate, tandis que NAD est réduit en NADH.

La réoxydation du même coenzyme est le corollaire de la transformation du pyruvate en lactate sous l'influence de la lactico-déshydrogénase.

En dépit de cet équilibre, une petite quantité de NADH subsiste dans l'hématie et permet l'action de la diaphorase-NADH dépendante.

- Cycle de RAPOPORT-LUEBERING (310).

Il est frappant de constater que plus de 90 % des esters phosphoriques de l'hématie sont sous forme d'acide 2,3-diphosphoglycérique (157). Cet ester est le résultat de la transformation du 1,3-diphosphoglycérate en présence d'une mutase. Le passage par ce shunt qui se situe en dérivation de la suite normale des réactions au niveau du 1,3-diphosphoglycérate, permet à l'érythrocyte de produire du 3-phosphoglycérate sans formation d'ATP. La phosphoglycérate kinase étant assez peu active, s'agit-il d'un déversoir de trop plein ou d'une forme de réserve pour le globule rouge ?

Le rôle du 2,3-diphosphoglycérate reste obscur à bien des égards, il a été bien étudié par CARTIER (87). Si sa formation diminue le gain d'ATP, il représente tout de même une réserve glucidique et énergétique non négligeable ; il peut être déphosphorylé en 3-phosphoglycérate et s'intégrer à nouveau dans la voie normale de la glycolyse (cas des hématies conservées).

Le 2,3 DPG est hydrolysé en 3-phosphoglycérate par une phosphatase spécifique, la 2,3-diphosphoglycérrophosphatase ; cette dernière est inhibée par le produit de la réaction (87).

Le 2,3 DPG intervient à l'état de traces comme coenzyme dans la transformation du 3-phosphoglycérate en 2-phosphoglycérate (87).

L'action énergétique du 2,3 DPG apparaît également dans le transport des cations ; les mammifères qui possèdent un potassium élevé comme l'homme ont également une concentration élevée en 2,3 DPG.

Enfin récemment, de nombreux travaux attribuent un rôle tout à fait nouveau et inattendu au 2,3 DPG. Il agirait comme un régulateur des propriétés allostériques de l'hémoglobine déterminant ainsi son rôle de donneur d'oxygène (7 - 16 - 126).

La concentration du 2,3 DPG a été démontrée systématiquement plus élevée chez les populations vivant à haute altitude, confirmant ainsi qu'il représente un facteur important de régulation de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène (127 - 147 - 287). Ces observations sont confirmées in vitro (7 - 294 - 385).

Il a été également démontré que la force de liaison du 2,3 DPG avec la molécule d'hémoglobine varie selon la nature de cette dernière ; ainsi la liaison est plus faible avec l'hémoglobine foetale comparée à l'hémoglobine adulte normale. Cette différence pourrait expliquer en partie la grande affinité du sang foetal pour l'oxygène (385).

Enfin des résultats expérimentaux très poussés font supposer que la liaison du 2,3 DPG et de l'hémoglobine s'établit au niveau de la molécule d'histidine située sur la chaîne β (β Hb^{-21 His}) (115 - 385).

Cet aspect récent du métabolisme du globule rouge contribue à détruire la conception simpliste qui représente l'érythrocyte comme un sac rudimentaire rempli d'une solution d'hémoglobine et d'enzymes, chacun des éléments étant indépendant l'un de l'autre et vis-à-vis du milieu extérieur.

La mise en évidence du rôle si particulier du 2,3 DPG constitue le premier exemple concret d'une relation possible entre les enzymopathies et les hémoglobinopathies.

- Rôle du glucose 1,6-diphosphate (87 - 93)

Mis en évidence par VANDERHEIDEN, il intervient comme coenzyme dans la transformation du glucose-1-phosphate en glucose-6-phosphate sous l'action de la phosphohexomutase.

Comme le 2,3-diphosphoglycérate, ce phospho-dérivé occupe une place à part dans le globule rouge où il existe à une concentration paradoxalement élevée comparée à celle des autres tissus.

Son rôle est actuellement encore mal défini. Un point est acquis: le G-1,6-DP n'est pas seulement un reliquat des stades évolutifs de la cellule, mais il se forme et est catabolisé dans l'hématie.

2. - LA VOIE GLYCOLYTIQUE DES PENTOSE.

Les travaux de BIRD (228) ont montré que la quantité d'acide lactique formé se situe aux environs de 92 à 93 % du glucose utilisé. Il reste donc 7 à 8 % de glucose qui empruntent une voie différente.

Le schéma global de cette seconde voie glycolytique découverte par DICKENS et HORECKER (dénommée voie des pentoses phosphates ou shunt des hexoses monophosphates) est représenté à la figure 2 (179).

Toute sa signification physiologique tient dans la nature du coenzyme de deux déshydrogénases : le NADP. Chaque molécule de glucose-6-phosphate catabolisée conduit deux molécules de NADP de la forme oxydée à la forme réduite, et forme une molécule de ribulose-5-phosphate.

Les réactions suivantes ne sont pas oxydatives et donnent naissance à divers oses phosphorylés. Notons que deux intermédiaires de la glycolyse sont biosynthétisés par cette voie métabolique : le fructose-6-phosphate et le glycéraldéhyde-3-phosphate, ce qui laisse penser que des interactions peuvent intervenir entre les deux voies.

L'intérêt du shunt est essentiellement l'approvisionnement de la cellule en NADPH ; l'utilisation des pentoses phosphates formés pour la synthèse de nucléotides à partir de purines préformées (240 - 241) étant peu développée.

Les pentoses-phosphates sont susceptibles de régénérer les hexoses monophosphates en empruntant les réactions de la voie non oxydative ; cela veut dire que le ribulose-5-phosphate formé au terme de la voie oxydative peut se transformer en une nouvelle molécule de glucose-6-phosphate qui en-

treprendra un nouveau cycle et permettra à nouveau la formation de NADPH.

La voie des pentoses phosphates assure ainsi le potentiel réducteur intracellulaire aux dépens de l'hydrogène du NADPH.

Le rôle de ce coenzyme est de première importance puisqu'il cède ses hydrogènes au glutathion, maintenant ce dernier sous sa forme réduite. Cela revient à dire que le NADPH protège toutes les protéines de la cellule contre l'oxydation.

Le rôle capital de la voie des pentoses résulte du fait qu'elle représente l'unique source de NADPH du globule rouge, c'est-à-dire la seule manière pour l'hématie de maintenir à l'état réduit les groupements SH des protéines et l'hémoglobine.

3. - LA REGULATION DE LA GLYCOLYSE.

Au terme de l'étude des deux voies glycolytiques, une question reste à poser : le glucose-6-phosphate est situé au carrefour des deux voies, quel hasard va décider les molécules à s'orienter plutôt dans une voie que dans l'autre ?

Le glucose-6-phosphate peut s'engager dans deux voies métaboliques, mais la phosphohéxoisomérase qui l'engage dans la voie d'EMBDEN-MEYERHOF est environ dix fois plus active que la déshydrogénase.

Comme nous l'avons dit, le shunt des pentoses phosphates représente un peu moins de 10 % du métabolisme glucidique total. Des expériences variées ont montré l'influence de substances diverses (iodacétate, cyanure, bleu de méthylène, etc...) et de conditions (pH, température, âge des hématies, etc...) sur cette régulation.

En 1964, MARKS (249) admettait que des variations importantes de l'activité des deux voies métaboliques peuvent intervenir sous l'influence

de divers facteurs physiologiques. Il n'est pas exclu en effet que les changements de concentration de substrats dans l'une ou l'autre voie exercent des effets activateurs ou inhibiteurs. Peut-être devrait-on reparler ici du rôle que peut jouer le 2,3-diphosphoglycérate...

La régulation peut aussi être la résultante du "débit" des réactions enzymatiques ; c'est dans cette hypothèse que RAPOPORT et Coll. (309) qualifient l'hexokinase de "pacemaker" de la glycolyse.

Il semble aujourd'hui que c'est accorder beaucoup d'honneur à cette enzyme, mais il n'en reste pas moins vrai que, comme l'a écrit CARTIER (87), les trois réactions kinasiques (hexokinase, phosphofructokinase, pyruvatekinase) sont les plus éloignées de leur état d'équilibre et constituent autant de goulets d'étranglement de la voie d'Embden-Meyerhof. Ces trois réactions ont une activité faible, ce sont des systèmes phosphorylants ou de recharge de l'ATP ; elles nécessitent toutes la présence d'ions Mg^{++} in vitro et toutes trois présentent un caractère allostérique et sont contrôlées par des intermédiaires de la glycolyse selon une cinétique de type allostérique.

Pour RAPOPORT (308), la vitesse de la glycolyse à pH 7,4 est déterminée par le jeu de l'hexokinase et de la phosphofructokinase ; l'activité des deux enzymes étant soumise à l'influence des substrats et des cofacteurs capables d'effets inhibiteurs et allostériques. Toujours selon RAPOPORT, à un pH supérieur à 7,8, le système de la 3-phosphoglycéraldéhyde-déshydrogénase entre en jeu et la régulation de la glycolyse dépend alors de l'hexokinase et de la 3-phosphoglycéraldéhyde-déshydrogénase.

Le shunt de RAPOPORT-LUEBERING apparaît évidemment comme un autre système de contrôle de la glycolyse, la phosphoglycérate kinase et la diphosphoglycérate mutase se trouvant en compétition pour l'utilisation du 1,3-diphosphoglycérate. La proportion des deux voies dépend pour une large part de la concentration en ADP et dans une moindre mesure de celles de l'ATP et du 2,3-diphosphoglycérate. Toutefois, les vitesses possibles de

décomposition du 2,3 DPG n'apparaissent pas encore clairement.

Enfin, deux autres étapes de contrôle sont proposées par RAPOPORT: les réactions sous l'influence de la pyruvate kinase et de la lacticodeshydrogénase.

La détermination des activités enzymatiques de la glycolyse in vitro montre une grande variation, l'hexokinase étant la plus lente et la triose-phosphate-isomérase le système le plus rapide. Mais l'activité du système le plus lent est encore plus rapide que l'activité glycolytique globale !

4. - LES AUTRES SOURCES D'ENERGIE.

Le glucose n'est pas la seule source énergétique utilisable par le globule rouge ; divers substrats peuvent servir de point de départ à la chaîne glycolytique : ce sont les nucléosides (145), le fructose, le mannose et surtout le galactose.

Les hexoses subissent une phosphorylation initiale suivie d'une isomérisation leur permettant d'entrer dans la voie d'Embden-Meyerhof.

L'existence des enzymes nécessaires à la transformation du fructose et du mannose n'a pas été démontrée dans l'hématie, mais l'incubation des hématies in vitro en présence de ces oses prouve qu'ils sont utilisés, toutefois dans une faible proportion pour le mannose.

Le mécanisme de la dégradation du galactose est mieux connu, tous les enzymes participant à son métabolisme ont été retrouvés dans l'hématie normale (Fig. 3).

L'étude détaillée de cette chaîne métabolique reste le plus souvent motivée par les cas pathologiques où manque la galactose-1-phosphate-

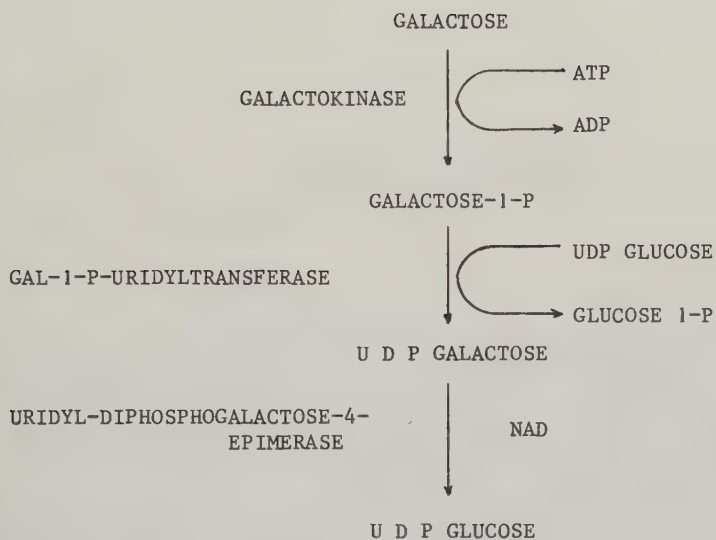


Fig. 3 : TRANSFORMATION DU GALACTOSE EN GLUCOSE

uridyl-transférase. La découverte récente (151) de déficits en galactokinase, dont nous décrirons un cas, en augmente encore l'intérêt, ceci sans compter la part importante qui revient au galactose dans le métabolisme de l'hématie normale du nourrisson.

C. - LES MECANISMES DE PROTECTION CONTRE L'OXYDATION.

Les systèmes de transfert d'électrons ou d'hydrogène répondent à cette définition.

Comme nous l'avons dit, les enzymes du métabolisme glucidique capables de former des coenzymes réduits sont la glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase pour le NADH, la glucose-6-phosphate-déshydrogénase et la 6-phosphogluconate déshydrogénase pour le NADPH.

L'hématie contient plusieurs réductases, qui en l'absence de chaîne respiratoire, utilisent les coenzymes réduits en régénérant les coenzymes oxydés ; ce sont essentiellement les méthémoglobine réductases et la glutathion réductase (189 - 349).

Outre ces systèmes faisant intervenir le NAD et le NADP, deux systèmes peroxydasiques jouent vraisemblablement un rôle important : celui de la glutathion réductase et celui de la catalase.

Deux objectifs sont proposés à l'action de ces mécanismes, le fer de l'hème de la molécule d'hémoglobine et les groupements SH des protéines de l'hématie qu'il s'agisse de l'hémoglobine ou des enzymes.

- Les diaphorases ou méthémoglobine réductases.

Dans le globule rouge normal, environ 1 % de l'hémoglobine se trouve à l'état de méthémoglobine. Forme oxydée de l'hémoglobine où le fer de l'état ferreux est passé à l'état ferrique, elle est incapable de trans-

porter l'oxygène moléculaire.

Théoriquement deux systèmes enzymatiques ont pouvoir de réduire la méthémoglobine (195). Pratiquement, un seul est actif dans les conditions physiologiques ; il est constitué par la diaphorase à NADH dont le rôle est démontré par l'existence d'une méthémoglobininémie marquée chez les sujets qui sont congénitalement dépourvus de cette enzyme ou chez qui elle présente une activité très diminuée (Fig. 1).

La seconde méthémoglobine réductase, appelée diaphorase NADPH dépendante, est capable de transporter l'hydrogène du NADPH sur la méthémoglobine, mais seulement en présence d'un intermédiaire d'oxydo-réduction comme le bleu de méthylène, le bleu de toluidine ou le bleu de Nil. Cette dernière condition rend improbable son fonctionnement dans l'hématie adulte à l'état physiologique. Aussi, certains considèrent cette enzyme comme un vestige de la chaîne respiratoire (195). Il n'en va pas de même sur les plans expérimental et thérapeutique : l'activité de la diaphorase à NADPH explique l'effet activateur du bleu de méthylène sur la voie des pentoses phosphates par réoxydation du NADPH et du point de vue thérapeutique, elle permet la compréhension de l'action efficace du bleu de méthylène dans le traitement des méthémoglobininémies acquises toxiques et des méthémoglobininémies congénitales par déficit en diaphorase NADH dépendante - dont nous décrirons deux cas observés dans une même famille.

- La glutathion réductase.

Le glutathion érythrocytaire se trouve presque totalement à l'état réduit ; le maintien sous cette forme est attribué à une glutathion réductase dont l'action est liée aux premières réactions de la voie des pentoses-phosphates génératrices de NADPH. Cette voie pourrait constituer le mécanisme principal de réoxydation du NADPH dans le globule rouge (Fig. 1). Un fait expérimental est certain ; la glutathion réductase est deux fois plus active avec le NADPH qu'avec le NADH (195). Cela est démontré par l'incubation expérimentale des hématies de sujets carencés en glucose-6-phosphate déshydro-

génase en présence d'acétylphénylhydrazine ; l'instabilité du glutathion réduit contraste avec la maintenancé du même substrat dans les hématies normales soumises aux mêmes conditions. C'est le test de BEUTLER. (27)

Le glutathion réduit est maintenu dans l'hématie à un taux suffisant pour faire face aux agressions des toxiques générateurs de peroxydes ou de radicaux libres ; il jouerait par ailleurs un rôle de régulation de l'activité de la voie des pentoses phosphates (195).

En fait, il exerce plus certainement un effet protecteur direct au niveau des groupements thiols de l'hémoglobine et de certaines enzymes que dans le maintien du fer de l'hémoglobine sous forme réduite.

Toutefois, l'observation de sujets carencés presque totalement en glutathion érythrocytaire et ne présentant paradoxalement aucune méthémoglobinémie concomitante montrent à quel point le rôle du glutathion réduit dans le métabolisme de l'hématie demeure confus.

- Les systèmes peroxydasiques.

Le globule rouge normal possède un équipement enzymatique spécial qui permet la décomposition de l'eau oxygénée et joue vraisemblablement de ce fait un rôle indirect dans la protection de l'hématie contre l'oxydation.

Deux systèmes enzymatiques principaux sont en cause : la glutathion peroxydase et la catalase. Le rôle de la catalase, constituant normal de l'érythrocyte, n'est pas clair. L'absence apparemment totale de trouble hémato-logique grave chez les sujets acatalasémiques met en doute la signification physiologique de l'enzyme. Quoiqu'il existe une série d'expériences démontrant son rôle protecteur d'une façon nette, il n'est pas possible à ce jour de porter un jugement définitif sur le rôle de la catalase érythrocytaire dans les conditions normales (1).

L'articulation dans l'hématie des systèmes qui viennent d'être dé-

crits reste mal connue car les connaissances fragmentaires que nous possédons rendent difficiles les essais d'explication. Si l'on s'en tient aux faits expérimentaux, deux points apparaissent : l'utilité de réoxyder constamment les nucléotides pyridiniques nécessaires au catabolisme du glucose, le maintien d'un état d'équilibre entre formes réduites et formes oxydées qui se traduit par la présence constante d'un potentiel réducteur intra-érythrocytaire (195).

La part des différents mécanismes les uns par rapport aux autres dans le maintien du potentiel réducteur est certainement variable au cours de la vie. Nous le discuterons à propos de la confrontation des activités métaboliques érythrocytaires chez l'adulte et dans le sang du cordon.

De toute façon, les observations cliniques démontrent que le système à diaphorase NADH dépendante constitue l'élément le plus important de protection, puisque sa carence détermine une méthémoglobinémie tandis que la diaphorase à NADPH semble avoir un rôle de secours.

Selon les travaux de SCOTT et Coll. (347), les activités réductrices déterminées in vitro à l'aide de systèmes enzymatiques purifiés d'origine adulte se répartiraient ainsi : diaphorase à NADH 73 %, acide ascorbique 12 %, glutathion réduit 9 %, diaphorase à NADPH 6 %.

D. - LES AUTRES VOIES METABOLIQUES.

Il a été dit au début de ce chapitre que le globule rouge voit son métabolisme se simplifier au cours de la maturation pour ne laisser subsister que les voies du catabolisme glucidique. Cela est vrai, mais là comme ailleurs, il y a quelques exceptions.

Le globule rouge mature n'est plus capable de synthétiser "de novo" les purines comme le pouvait encore le réticulocyte, mais demeure susceptible de réaliser la synthèse des nucléotides adényliques à partir de

l'adénine. Par action de la phosphoribosyltransférase, en présence de phosphoribosylpyrophosphate, il se forme de l'AMP (87).

Le métabolisme des purines dans l'hématie a été bien étudié par BARTLETT et BUCOLO (12) mais la signification de cette synthèse physiologique de nucléotides adényliques demeure imprécise.

Il n'empêche que les observations selon lesquelles des globules rouges, incubés en présence soit d'inosine et d'adénine, soit d'adénosine, forment de l'A.T.P. présentent un réel intérêt dans la recherche de formules nouvelles pour les solutions de conservation du sang frais. Ceci dans le but d'améliorer les conditions et d'allonger la durée de conservation actuellement obtenues avec la solution A.C.D.

Le métabolisme des purines présente aussi un vif intérêt clinique; la mise en évidence d'un déficit en hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransférase érythrocytaire est devenue un signe biologique précis, facilement accessible et primordial de l'encéphalopathie familiale avec hyperuricémie (218).

La synthèse du NAD à partir de précurseurs a également été démontrée (87). Notons enfin la persistance dans l'hématie de quelques séquences du cycle tricarboxylique ; on a pu mettre en évidence la fumarase, la malicodeshydrogénase, l'aconitase et l'isocitrique deshydrogénase.

E. - L'EVOLUTION BIOCHIMIQUE DU GLOBULE ROUGE.

"La vieillesse débute dans le germe, et le développement se poursuit jusqu'à la mort". Cette formule écrite à l'intention de l'homme dans son ensemble s'applique parfaitement à ses globules rouges.

A compter du moment où l'hématie est lâchée dans la circulation, sa durée de vie est fixée à quelque 120 jours pendant lesquels elle va vieillir.

Les réticulocytes possèdent des propriétés métaboliques que n'ont pas les cellules matures. Ils sont capables de respirer, possédant les enzymes du cycle de Krebs, d'incorporer la glycine et la protoporphyrine dans l'hémoglobine et de synthétiser des protéines car ils possèdent de l'acide ribonucléique.

Ces fonctions disparaissent avec la maturation cellulaire.

De nombreuses études (161 - 248 - 284) ont montré des activités enzymatiques variant avec l'âge de la cellule, les activités les plus abondantes étant souvent l'apanage des cellules jeunes. La normalisation des valeurs interviendrait environ après deux mois (244).

Les populations érythrocytaires jeunes glycolysent plus que les cellules âgées. Selon BERNSTEIN (26) la glycolyse des réticulocytes serait environ huit fois plus importante que celle des cellules âgées et cinq fois celle des populations d'âge moyen.

La capacité d'utilisation du galactose est également diminuée pour les cellules âgées. Ainsi, les voies principales d'utilisation des sucres ralentissent avec la sénescence globulaire : il est logique de penser que les fonctions de la cellule sont freinées d'autant.

Après cent jours d'existence, le globule va vivre au ralenti jusqu'au moment où il sera capté par le système réticulo-histiocytaire. Le vieillissement de la cellule se traduit au laboratoire par des modifications qualitatives et quantitatives intéressant sa morphologie, ses constantes physiques, ses paramètres chimiques.

Le globule rouge résiste moins bien à l'hémolyse hypotonique en vieillissant ; sa forme tend à devenir celle d'un sphérocyte, et une diminution des charges électriques intervient.

La teneur en eau et en ions minéraux diminue avec l'âge, la fuite du potassium étant particulièrement importante.

MARKS (248) a pu mettre en évidence une diminution de l'incorporation du carbone ^{14} dans les lipides de la membrane érythrocytaire traduisant une baisse du cholestérol et de la lécithine.

Le ralentissement de la glycolyse par la voie d'Embden-Meyerhof et la diminution d'activité de la voie des pentoses phosphates freinent la production du NADH et du NADPH, ce qui se traduit par une augmentation de la concentration en méthémoglobine.

D'autres altérations ont été mises en évidence, en particulier, l'affaiblissement de la presque totalité des activités enzymatiques.

Quoiqu'il en soit, les causes exactes, et surtout la cause initiale du déclin du globule rouge, demeurent incertaines même si de nombreuses modifications ont été observées.

Les recherches des dernières années font souvent penser que la cause de la mort de la cellule se situe dans un arrêt métabolique lui-même dû à l'inactivation d'une enzyme mais aucun argument décisif permettant d'éliminer les autres mécanismes n'a été affirmé.

L'intérêt des questions posées et l'incertitude des réponses sont autant d'arguments en faveur de l'étude des globules rouges à différentes périodes d'âge. Du point de vue pratique, ces études se heurtent aux difficultés techniques de séparation des cellules selon l'âge. Différents moyens de différenciation sont utilisables (91 - 300), mais leur réalisation demeure délicate et les qualités de préparations obtenues sont rarement satisfaisantes pour tous les critères qu'il est souhaitable de réunir en vue d'une interprétation rigoureuse des résultats.

CHAPITRE II : LES ENZYMES DU GLOBULE ROUGE

Preuve concrète des progrès considérables de la pathologie moléculaire durant les dernières années, un nombre croissant d'anomalies héréditaires, quantitatives ou qualitatives, d'une protéine spécifique de l'hématie a été rapporté.

Lorsque le désordre porte sur une enzyme, ce sont les érythroenzymopathies ; lorsqu'il atteint l'hémoglobine, ce sont les hémoglobinopathies. A côté de ces deux chapitres fondamentaux de la pathologie du globule rouge, il est vraisemblable que des anomalies de structure de la membrane globulaire soient également responsables d'affections hématologiques ; c'est peut-être le cas de la sphérocytose héréditaire.

Pour mieux comprendre le rôle de chaque enzyme, et l'incidence d'un déficit éventuel sur le métabolisme de l'hématie, il convient de résumer pour chacune d'elles, et pour quelques substrats et coenzymes particulièrement importants, leurs propriétés physico-chimiques, leurs aspects biochimiques, leur comportement génétique - et aussi la nature des anémies hémolytiques congénitales non sphérocytaires qui peuvent résulter de leur absence.

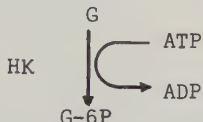
H E X O K I N A S E

Nomenclature : E.C. 2.7.1.1.

ATP : D hexose 6-phosphotransférase

Abréviation : HK

Réaction :



Déficit : Très rare (3 cas)

Clinique : Hémolyse sévère (?)

Génétique : Caractère autosomique récessif (?)

Catalyseur de la première étape de la voie d'Embden-Meyerhof, les propriétés et le rôle de l'hexokinase demeurent incertains tant les nombreux travaux et les rares observations de déficits sont l'objet de controverses.

Cette situation résulte de la faible activité de l'enzyme qui rend délicate sa mesure et son identification, et aussi de sa situation même de première étape de la glycolyse, ce qui rend caduques les enseignements fournis par le dosage du substrat, en l'occurrence le glucose.

L'hexokinase est incontestablement, parmi les enzymes de la glycolyse, celle dont l'activité est la plus faible. Fort de cette constatation, on a voulu lui attribuer le rôle de facteur limitant de la glycolyse, mais l'observation déjà ancienne de la forte augmentation de la glycolyse en présence de bleu de méthylène démontre avec certitude que l'hexokinase ne constitue pas dans les conditions physiologiques le seul facteur limitant de la consommation du glucose par l'hématie.

Par contre, l'hexokinase participe à la régulation de la glycolyse;

rappelons qu'elle fait partie avec la phosphofructokinase et la pyruvate kinase des trois systèmes enzymatiques les plus éloignés de leur état d'équilibre.

Selon CARTIER (87), le glucose-6-phosphate produit de la réaction, régule la phosphorylation du glucose par un mécanisme d'inhibition allostérique, et la vitesse de la glycolyse serait très sensible aux facteurs modifiant la vitesse d'utilisation du glucose-6-phosphate. La concentration en ATP et celle du glucose 1,6-diphosphate participent vraisemblablement aussi à la régulation de la phosphorylation (87 - 281).

Des travaux récents, dûs à BEUTLER et TEEPLE (42), démontrent que le glutathion oxydé ne peut jouer le rôle d'inhibiteur physiologique de l'hexokinase car l'inhibition de l'activité enzymatique exige des concentrations trop élevées. Par contre, on peut penser que la phosphorylation initiale du glucose est peut-être le lieu d'inhibition de la glycolyse en milieu acide (conservation en milieu ACD) puisque la glycolyse et l'activité de l'hexokinase semblent avoir la même dépendance vis-à-vis du pH (87).

Depuis quelques années, de nombreux travaux sont consacrés à l'étude des propriétés de la molécule enzymatique (45 - 109 - 190 - 266 - 299).

La mise en oeuvre de modalités techniques différentes sur des milieux divers (gel d'amidon, gel de polyacrylamide, acétate de cellulose) associés à la difficulté de révéler l'enzyme, ne rend pas simple l'appréciation de nos connaissances des isoenzymes de l'hexokinase (201 - 211 - 230).

Les premiers travaux remontent à 1959 où trois isoenzymes différentes étaient séparées. Par la suite, la situation devint vite confuse : EATON et Coll. (128), en 1966, séparaient huit bandes distinctes réparties en deux zones retrouvées en 1967 par HOLMES et Coll. (173), mais ce dernier précisait l'existence d'une bande particulière aux hématies de nouveau-né

et du jeune enfant ; cette bande particulière, appelée type II, également mise en évidence dans les hématies de sujets adultes porteurs d'une hémoglobine F, fait alors suspecter l'association du type II de l'hexokinase à la présence de l'hémoglobine foetale - et l'hypothèse d'une régulation de la synthèse du type II de l'hexokinase en rapport avec celle de la chaîne γ de l'hémoglobine fut proposée.

En 1967 également, GALTON et JONES (146) étudiant le comportement électrophorétique de l'hexokinase en gel de polyacrylamide observent une ou deux bandes d'activité selon les tissus, et une bande dans les hémolysats d'adultes sains. Toutefois, mis à part l'emploi d'un support d'électrophorèse différent des autres expérimentateurs, la concentration en glucose du réactif de révélation était susceptible d'inhiber la mise en évidence du type III. Les mêmes auteurs rapportent l'observation d'une bande, migrant plus rapidement, dans l'hémolysat d'un enfant âgé de trois mois et porteur d'une anémie hémolytique.

En 1968, l'application d'une nouvelle méthode de révélation, de sensibilité supérieure, substituant l'observation de la fluorescence du NADPH à celle du précipité de formazan semble éclairer quelque peu la situation (197 - 342).

Utilisant cette technique, SCHROTER et TILLMANN (342) retrouvent les types I et III, mais non le type II ; pour ces auteurs l'isoenzyme II serait un artéfact dû à l'interruption de la bande I par la migration à cet endroit de l'hémoglobine foetale ; celle-ci n'étant pas révélée par le bleu de tétrazolium.

En 1968 également, KAPLAN et BEUTLER (197) utilisant aussi la révélation par fluorescence aboutissent à des conclusions semblables mais en insistant toutefois sur la présence de mobilités électrophorétiques différentes des isoenzymes du sang de cordon, le type I étant clivé en deux fractions qu'ils désignent, selon l'ordre de mobilité croissante, type I_A

et type I_F. Cette dernière bande présente une intensité plus marquée dans le sang de cordon, alors que l'importance des deux bandes chez l'adulte semble équivalente.

A la suite de ces travaux, les isoenzymes de l'hexokinase apparaissent au nombre de deux. Mais MALONE et Coll. (246), faisant d'ailleurs mention des travaux de KAPLAN et BEUTLER, réaffirmaient bientôt que l'hexokinase existait bien sous trois formes séparées par électrophorèse en gel d'amidon, mais aussi par chromatographie sur DEAE - cellulose. Pour ces auteurs, le type II est l'isoenzyme prédominant dans les érythrocytes du nouveau-né, mais il est aussi retrouvé à des taux très faibles chez l'adulte sain.

Mis à part cette controverse, l'intérêt majeur des expériences de MALONE et Coll. est d'un autre ordre : ils ont démontré que la présence du type II n'est pas une fonction de l'âge des hématies et mis en évidence une augmentation nette de l'activité hexokinasiqye de type II dans les hématies de sujets adultes porteurs homozygotes et hétérozygotes des hémoglobines S ou C. Les auteurs ont eu le mérite de montrer que la mobilité électrophorétique de l'isoenzyme II n'est pas modifiée par la présence de l'une ou l'autre de ces hémoglobines pathologiques (246).

Ces résultats remettent en cause l'hypothèse émise en 1967 par HOLMES (173). Ce dernier croyait avoir décelé une relation entre le type II de l'hexokinase et la chaîne γ de l'hémoglobine foetale, mais les malades de MALONE et Coll., porteurs d'hémoglobine S ou C, présentent une bande de type II augmentée sans anomalie de l'hémoglobine foetale. Par contre, tous sont atteints d'une diminution de synthèse de la chaîne β de l'hémoglobine. Cela indiquerait l'existence d'une liaison entre la régulation de la synthèse de la chaîne β de l'hémoglobine et la composition enzymatique de l'érythrocyte qui n'avait pas été envisagée jusqu'alors.

Sur le plan clinique, les choses ne sont guère plus claires. Le dé-

ficit primaire en hexokinase existe-t-il ?

Si l'on exclut la description en 1965 par LOHR et Coll. (238) d'une hexokinase quantitativement et qualitativement anormale présente dans les hématies, mais aussi dans les leucocytes et les plaquettes de trois malades atteints d'une panmyélopathie de type Fanconi associée à des anomalies du caryotype, l'observation de VALENTINE et Coll. (382), rapportée en 1967, serait le premier cas mondial relatant un déficit primaire en hexokinase.

Quelques mois plus tard, COTTE et Coll. (108) décrivaient le même déficit et tout récemment, en novembre 1969, KEITT (202) fait état d'un patient porteur d'une hexokinase anormale.

A vrai dire, aucune de ces observations n'est pleinement satisfaisante.

Le malade de VALENTINE est dit porteur homozygote du déficit en raison de la gravité des accidents hémolytiques observés alors que la valeur de l'enzyme égale 60 % de la normale. Les mesures d'activité ont été réalisées après splénectomie et les auteurs insistent sur le fait d'une population érythrocytaire très jeune masquant certainement un déficit plus profond. On sait en effet que les réticulocytes et les cellules jeunes possèdent une activité hexokinasiqque très augmentée.

En dehors de la diminution d'activité de l'enzyme, aucune altération qualitative n'a été décelée et le déficit n'est pas retrouvé dans les autres éléments figurés ; ce dernier point est en désaccord avec les résultats de LOHR. Les autres signes biochimiques se résument à une activité glycolytique légèrement diminuée in vitro, tandis que la consommation de galactose est accrue. Signalons encore que la résistance globulaire osmotique déterminée avant splénectomie était perturbée dans le sens d'une augmentation.

Le père et la mère du malade, indemnes du point de vue clinique, sont déclarés porteurs hétérozygotes de la tare avec des taux d'hexokinase respectivement de 60 à 80 % des valeurs normales. Bien plus, le frère du malade, chez qui l'activité de l'hexokinase ne représente que 30 % du taux habituel, soit une valeur inférieure à celle du malade, ne présente aucun signe d'hémolyse.

Dans le cas français décrit par COTTE, le malade dont l'activité hexokinase est de l'ordre de 40 % de la normale est le père d'un enfant porteur d'un déficit en glucose-6-phosphate deshydrogénase associé à un abaissement net de l'hexokinase (25 % du taux normal). La mère de l'enfant est reconnue transmettrice de la tare pour la G-6PD.

Il s'agit là d'une observation complexe dont on peut retenir les points suivants :

- le père déficient en hexokinase ne présente ni anémie, ni hémolyse, ni splénomégalie.

- l'enfant est porteur d'une anémie hémolytique due à un déficit en G-6PD. Le déficit en hexokinase de cet enfant n'est peut-être que la conséquence du déficit en G-6PD, si l'on admet l'hypothèse selon laquelle la diminution de la production du NADPH provoquerait une altération des groupements thiols ; l'hexokinase possédant six groupements sulfhydriles qui pourraient être oxydés.

Si cette hypothèse n'est pas retenue, il faut considérer le déficit de l'enfant comme hérité du père.

La dernière observation due à KEITT n'est pas moins confuse. Il s'agit d'un malade porteur d'une anémie persistante qui a été splénectomisé à l'âge de 23 ans. Du point de vue biochimique, l'observation s'est d'abord appuyée sur une diminution nette de la concentration des hématies en glucose-6-phosphate ; cette diminution a été retrouvée chez la mère et

la soeur du malade.

L'activité de l'hexokinase, mesurée peu après, se situe environ à 50 % de la normale, mais le déficit n'est pas retrouvé si l'hémolysat est préparé en présence de glucose ; il est moindre en présence d'éthylène-diamine-tétra-acétate, de 2-mercaptoéthanol et d'ATP. L'activité de l'enzyme leucocytaire est normale.

KEITT conclut en la présence d'une hexokinase anormale labile en l'absence de glucose. L'observation est critiquable, car le taux de glucose-6-phosphate n'est pas seulement contrôlé par l'hexokinase, mais aussi par la G-6PD et la phosphofructokinase.

Que conclure ? Du point de vue clinique, la plupart des auteurs s'accordent à penser qu'un déficit en hexokinase devrait entraîner des troubles hémolytiques graves s'appuyant en cela sur la place de régulateur de la glycolyse attribuée à l'enzyme.

Si cette position est défendable, l'absence souvent démontrée de relation entre l'intensité d'un déficit quelconque et la gravité des troubles hématologiques observés ne lui donne aucune valeur absolue.

En bref, deux choses sont certaines, l'étude des propriétés biochimiques de l'hexokinase devra être précisée et un déficit primaire net reste à découvrir.

P H O S P H O H E X O M U T A S E

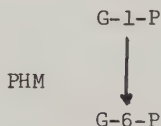
Nomenclature : E.C. 2.7.5.1.

α -D-glucose-1,6-diphosphate :

α -D-glucose-1-phosphate-phosphotransférase

Abréviation : PHM

Réaction :



Déficit : Inconnu

Génétique : Caractère autosomique dominant (?)

La phosphohexomutase (PHM) ou phosphoglucomutase est une phosphotransférase qui catalyse le transport d'un groupement phosphorylé du C₁ sur le C₆ du glucose.

L'enzyme est spécifique de l' α -glucose, mais elle peut aussi transformer très lentement le fructose-1-phosphate en fructose-6-phosphate (296); le système enzymatique serait en partie régulé par le glucose-1,6-diphosphate qui ne constituerait pas obligatoirement une étape intermédiaire de la réaction (297). Le galactose-1,6-diphosphate agirait comme un inhibiteur compétitif de la phosphoglucomutase (181).

L'étude de cette enzyme sur le plan clinique est actuellement intéressante ; aucun déficit n'ayant été décrit à ce jour.

L'intérêt qui s'attache à l'étude de la phosphoglucomutase est ailleurs. A l'électrophorèse, l'enzyme se sépare en sept bandes distinctes qui

déterminent différents phénotypes. Ce polymorphisme important confère à l'enzyme un intérêt anthropologique certain, que nous n'envisagerons pas ici, mais qui fait l'objet de nombreux travaux (111 - 130 - 150 - 172 - 185 - 220 - 264 - 265 - 313 - 401).

Parmi les sept phénotypes connus, trois seulement apparaissent couramment dans la race blanche. Ils sont déterminés par deux gènes autosomes allèles et récemment un troisième locus portant un gène de structure a été mis en évidence (176 - 177).

Les gènes seraient transmis comme un caractère héréditaire dominant.

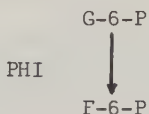
P H O S P H O - H E X O - I S O M E R A S E

Nomenclature : E.C. 5.3.1.9.

D-glucose-6-phosphate cétol-isomérase

Abréviation : PHI

Réaction :



Déficit : rare (3 cas)

Clinique : Hémolyse sévère

Génétique : Transmission autosomique récessive (?)

La phosphohexoisomérase (86 - 138 - 358) catalyse la conversion du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate. Des isoenzymes ont été mis en évidence par électrophorèse en gel d'amidon (86 - 290).

La phosphohexoisomérase n'est pas une enzyme limitante de la glycolyse (87) et pourtant le premier cas d'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire associée à son déficit a été rapporté en 1968 par BAUGHAN, VALENTINE, PAGLIA et Coll. (14) chez un garçon de 16 ans né de parents français et irlandais.

Un second cas, publié en 1969, dû à la même équipe de chercheurs (290) étudie le déficit chez 3 garçons issus d'une même fratrie de sept enfants.

Enfin CARTIER, TEMKINE et GRISCELLI (94) ont rapporté au VIIe Congrès International de Chimie Clinique de Genève (septembre 1969) le premier cas français. Le déficit affecte un enfant de 5 ans atteint dès la naissance d'une anémie hémolytique de cause jusqu'alors indéterminée.

Bien qu'il s'agisse d'une rareté biochimique, les trois observations présentent une certaine homogénéité tant du point de vue clinique que biochimique. L'anémie hémolytique est sévère, et nécessite des transfusions répétées. L'examen du sang montre une très importante réticulocytose (allant de 30 à 73 % chez les trois garçons observés par BAUGHAN et Coll.).

Comme c'est le cas dans les anémies hémolytiques par déficit en pyruvate-kinase, la splénectomie pratiquée chez les malades américains a été suivie par une amélioration permettant de suspendre ou d'espacer les transfusions, sans éliminer l'hémolyse et la réticulocytose.

La durée de vie des hématies a été étudiée chez le premier malade observé par VALENTINE ; les hématies normales marquées au Cr 51 ont une demi-vie de 30 jours alors que les hématies du malade ne montrent qu'une demi-vie de 4,5 jours.

En dehors de la phosphohexoisomérase, toutes les enzymes glycolytiques ont une activité normale ou augmentée en rapport avec le nombre des réticulocytes.

La phospho-hexo-isomérase a été trouvée à 19 % de la normale alors que la réticulocytose était de 28 % chez le premier malade, de 14 à 30 % chez les 3 garçons décrits par BAUGHAN et de 40 % pour le malade observé par CARTIER. Compte tenu de la présence de réticulocytes en grand nombre, les déficits découverts jusqu'alors sont donc toujours sévères.

Le déficit enzymatique est retrouvé dans les leucocytes (lymphocytes et granulocytes). La tare est également mise en évidence chez les parents et les collatéraux des malades qui ne présentent aucune manifestation hématologique, mais dont l'activité phosphohexoisomérasique approche seulement 50 % des valeurs normales.

La concentration en ATP est normale chez les malades et CARTIER précise que le déficit ne s'accompagne d'aucune modification de l'équilibre

des intermédiaires de la glycolyse ; mais il signale une modification dans la distribution des pyridine-nucléotides (94).

La détermination de la constante de Michaelis a montré une affinité normale de l'enzyme pour le fructose-6-phosphate et la recherche d'inhibiteurs de l'enzyme est demeurée négative (290).

La répartition du glucose-6-phosphate entre la voie d'Embden-Meyerhof et le shunt des pentoses demeure normale (290).

Les avis sont partagés au sujet de la mobilité électrophorétique de l'enzyme en gel d'amidon. Pour CARTIER, qui conduit l'électrophorèse à deux pH distincts (7,0 et 8,1), la migration est analogue à celle des témoins; tandis que les auteurs américains estiment déceler chez leurs malades des isoenzymes de mobilité différente.

L'étude familiale indique une transmission génétique de la tare conforme au mode autosomique récessif, les sujets hétérozygotes étant asymptomatiques, et les sujets homozygotes atteints d'un syndrome hémolytique sévère.

Quel est le mécanisme de l'hémolyse ? On peut formuler l'hypothèse suivante - La diminution d'activité de la phosphohexoisomérase se traduit par l'accumulation du glucose-6-phosphate, lequel, nous le savons, régule et inhibe l'hexokinase. Ce manque d'activité de l'hexokinase favoriserait l'hémolyse.

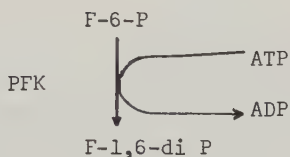
P H O S P H O - F R U C T O - K I N A S E

Nomenclature : E.C. 2.7.1.11.

ATP: D-fructose-6-phosphate-1-phosphotransférase

Abréviation : PFK

Réaction :



Déficit : Exceptionnel (1 cas associé au déficit total du muscle en PFK)

Clinique : Hémolyse modérée

Génétique : Transmission autosomique récessive (?)

Ici, l'intérêt biochimique et l'importance métabolique surpassent de loin l'intérêt clinique. La réaction réglée par la phosphofructokinase constitue certainement l'étape régulatrice la plus importante de la voie glycolytique dans tous les tissus (216).

Enzyme irréversible, elle est sensible à de multiples facteurs allostériques (224 - 279) ; elle est fortement inhibée par l'un de ses substrats, l'ATP. Cette inhibition serait levée par le fructose-6-phosphate et le fructose-1,6-diphosphate d'une part, et aussi par AMP, ADP et les ions phosphates (214).

Il est probable que la sensibilité de la PFK au rapport ATP/ADP-AMP soit le facteur décisif de la fonction de régulation de l'enzyme (141 - 224-225). Cela conduirait à une régulation par oscillations qui n'est pas sans analogie avec le fonctionnement des écluses de nos canaux : lorsque l'ATP s'élève à un certain seuil, la PFK est inhibée ce qui a pour conséquence la limitation du flux glycolytique, soit l'accumulation d'ADP et AMP d'une

part, la diminution d'ATP d'autre part. La concentration en ATP s'abaisse jusqu'au moment où les conditions de départ du système enzymatique sont à nouveau réalisées. La PFK n'est plus inhibée par l'ATP, l'inhibition est levée par l'ADP et l'AMP : un nouveau cycle s'amorce (87).

Du point de vue structural, l'enzyme musculaire, qui est la plus étudiée, se comporte comme un tétramère constitué de quatre sous-unités identiques pouvant exister sous deux conformations aux propriétés nettement différentes (289). Ces modifications allostériques sont sensibles au pH (87), et selon CHAPMAN (97) les groupements sulfhydriles sont étroitement associés au site catalytique de la PFK mais n'interviennent pas dans l'inhibition de l'enzyme par l'ATP et la réactivation par AMP.

Du point de vue clinique, peu de choses sont connues. Une observation rapportée en 1969 fait état de la coexistence chez le même malade d'une myopathie et d'une anémie hémolytique ayant pour cause commune une déficience en phosphofructokinase, totale dans le muscle, à 50 % de la normale dans les hématies (372).

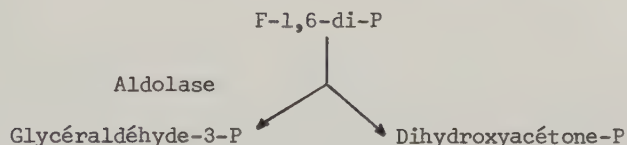
FRUCTOSE - 1 , 6 - D I P H O S P H A T E A L D O L A S E

Nomenclature: E.C. 4.1.2.13.

Fructose-1,6-diphosphate D-glycéraldéhyde-3-phosphate-lyase

Abréviation : Aldolase

Réaction :



Déficit : 1 observation

Clinique : (sphérocytose ?)

Génétique : Transmission autosomique dominante (?)

La fructose 1,6-diphosphate aldolase (116 - 184) transforme le fructose-1,6-diphosphate en deux trioses-phosphates : le glycéraldéhyde-3-phosphate et le dihydroxyacétone-phosphate. Le glycéraldéhyde-3-P représente la forme réactive ultérieurement transformée sous l'effet des systèmes enzymatiques de la cellule.

L'aldolase, malgré sa faible activité (la plus faible après celle de l'hexokinase) ne constitue pas une enzyme limitante de la glycolyse.

Peu de travaux lui ont été consacrés dans le globule rouge. On peut retenir les publications déjà anciennes de CORSINI (106 - 107), lequel a montré que 40 % de l'activité aldolasiq ue était liée au stroma. On sait aussi que l'activité de l'enzyme décroît avec l'âge de la cellule et des travaux tout récents dûs à HATZFELD et SCHAPIRA (169) font état de deux types d'aldolase dans le globule rouge de lapin ; la même équipe de chercheurs avait précédemment décelé trois types d'aldolase dans le foie humain (333).

Du point de vue clinique, aucun déficit n'avait été décelé jus-

qu'en 1969 où CHAPMAN fait état d'une diminution d'activité de l'enzyme allant de 18 à 53 % des valeurs normales chez vingt patients porteurs d'une sphérocytose congénitale. Les mesures d'activité ont été effectuées chez les malades déjà splénectomisés sauf deux (96).

Au premier abord, ces résultats sont quelque peu déconcertants car d'autres chercheurs (53 - 232) qui avaient émis l'hypothèse d'une anomalie métabolique primitive de la glycolyse n'ont pu mettre en évidence de déficit enzymatique de quelque nature que ce soit. Mais ils s'accordent pour dire que les activités enzymatiques des patients d'anémies de Minkowski-Chauffard sont généralement augmentées, cette augmentation étant en relation certaine avec une population érythrocytaire jeune.

Or, CHAPMAN dans ses résultats insiste sur le fait qu'il a tenu compte dans l'expression de ses résultats de l'âge moyen des cellules explorées, âge qui a été déterminé par marquage isotopique - et démontre que c'est la condition indispensable pour déceler le déficit en aldolase.

CHAPMAN argumente son observation en signalant que les porteurs hétérozygotes d'autres anomalies enzymatiques, telles que le déficit en G-6 PD et en pyruvate kinase, ont des pourcentages d'activité par rapport à la normale qui concordent avec ses résultats.

Reste à expliquer une relation possible entre un déficit en aldolase et l'obtention d'un sphérocyte. Toujours selon CHAPMAN, la perméabilité accrue au sodium reflétant une altération vraisemblable des phospholipides de la membrane du sphérocyte est explicable si l'on considère qu'un des produits de la réaction aldolasique, la dihydroxyacétone-phosphate, connu comme un important précurseur des phospholipides dans les autres tissus, est synthétisé en quantité insuffisante dans l'érythroblaste. En effet, l' α -glycérophosphate deshydrogénase nécessaire à l'utilisation du dihydroxyacétone-phosphate pour conduire aux phospholipides disparaît presque totalement dans l'érythrocyte adulte.

Il est bien évident que d'autres travaux devront préciser l'hypothèse de CHAPMAN qui, si elle se révélait exacte, obligerait à revoir la classification des anémies hémolytiques congénitales enzymopéniques.

Tout récemment, HANES, PATTERSON et VAN EYS (164) estiment que les variations observées par CHAPMAN ne sont que la conséquence du mode d'expression des résultats rendu incertain à la fois par la forme anormale et l'âge des hématies. On doit convenir qu'il est surprenant que la diminution d'une activité enzymatique pourrait conduire à la formation de sphérocytes alors que les autres déficits enzymatiques connus ne se traduisent jamais par une altération morphologique de l'hématie.

Précisons enfin que GREENBERG et TANAKA (158), faisant état des travaux de CHAPMAN, ont cherché sans succès un déficit en aldolase chez 5 membres d'une famille porteurs d'une élliptocytose.

T R I O S E - P H O S P H A T E - I S O M E R A S E

Nomenclature : E.C. 5.3.1.1.

D.Glycéraldéhyde-3-phosphate cétoI-isomérase

Abréviation : TPI

Réaction :



Déficit : 3 familles

Clinique : Hémolyse sévère + dysfonctionnement neuromusculaire +
susceptibilité infectieuse

Génétique : Caractère autosomique récessif (?)

La triose-phosphate-isomérase est l'enzyme qui transforme réversiblement l'un en l'autre les deux trioses-phosphates nés de la scission enzymatique du fructose-1,6-diphosphate par l'aldolase. Normalement, l'isomérisation se fait dans le sens de la transformation du dihydroxyacétone-phosphate en glycéraldéhyde-3-phosphate (79).

Parmi les enzymes de la voie d'Embden-Meyerhof, la TPI présente l'activité la plus intense. Des essais de séparation réalisés par SCHNEIDER et Coll. (338) par chromatographie sur DEAE-Séphadex permettaient d'obtenir deux fractions dont l'homogénéité était suspecte ; KAPLAN et Coll. (200) ont démontré la présence de trois formes principales, et d'une quatrième bande peu visible de mobilité supérieure par électrophorèse en gel d'amidon. On peut supposer que les trois isoenzymes principales résultent de l'agrégation de deux dimères principaux, mais il est également possible de considérer chaque forme comme un polymère d'une chaîne polypeptidique simple (80).

Le déficit en triose-phosphate-isomérase érythrocytaire a été décrit la première fois en 1965 par SCHNEIDER et Coll. (336). Depuis cette date, les mêmes auteurs ont fait état d'une autre observation de ce déficit chez plusieurs jeunes enfants d'une même famille (383).

Cette déficience reste donc une rareté hématologique, mais son étude dépasse le cadre de cette discipline ; parmi les érythroenzymopathies actuellement connues, le déficit en TPI est le seul où l'anémie hémolytique, d'ailleurs franche et mal supportée, est accompagnée de troubles neurologiques et musculaires progressifs ainsi que d'une prédisposition évidente aux syndromes infectieux.

Les troubles neurologiques sont divers et consistent pour certains en spasticité avec hyperréflexibilité tendineuse, dans d'autres en hypotonie diffuse avec abolition des réflexes tendineux ressemblant à une polynévrite. Un retard de développement mental a été également observé et l'évolution fut fatale dans plusieurs cas (336 - 337 - 338).

Le déficit en TPI intéresse les globules rouges et les leucocytes; il a aussi été retrouvé dans le muscle, le sérum et le liquide céphalo-rachidien ce qui donne à penser qu'il atteint tous les tissus.

L'activité de l'enzyme déficiente ne dépassait guère le dixième des valeurs normales chez les sujets explorés, malgré une réticulocytose élevée. L'étude familiale permet de mettre en évidence une transmission autosomale récessive du déficit ; les sujets hétérozygotes dont l'activité enzymatique approche 50 % sont normaux sur les plans clinique et hématologique.

En raison de l'activité habituellement élevée de la TPI, un déficit même aussi important que ceux observés maintient une activité nettement supérieure à celle des enzymes limitantes. Il a d'ailleurs été démontré que la glycolyse in vitro et la production de lactate sont augmentées. Ceci a permis de supposer un mécanisme de compensation du blocage métabolique par le shunt des hexoses monophosphates qui rejoint la voie d'Embden-Meyerhof au niveau du fructose-6-phosphate d'une part et surtout du glycéraldéhyde-3-phosphate, c'est-à-dire d'un métabolite situé au-delà du blocage.

A ce jour, le mécanisme de l'hémolyse reste inexpliqué.

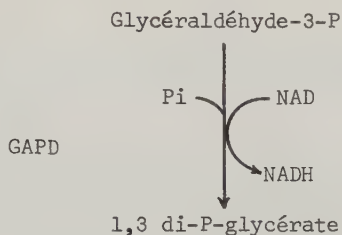
GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE-DESHYDROGENASE

Nomenclature : E.C. 1.2.1.13

D-Glycéraldéhyde-3-phosphate : NADP oxydoréductase

Abréviation : GAPD

Réaction :



Déficit : 1 cas

Clinique : Anémie bien compensée

Génétique : (?)

La GAPD catalyse la transformation du glycéraldéhyde-phosphate en 1,3 di-phosphoglycérate ; l'importance de la réaction réside dans la réduction du NAD en NADH, ce dernier permettant l'action de la diaphorase NADH dépendante.

Bien que d'assez nombreux travaux soient consacrés à l'étude de cette enzyme dans les levures, les microorganismes et les tissus animaux, la GAPD du globule rouge n'a pas fait à notre connaissance l'objet de recherches fondamentales importantes.

Un déficit a été décrit chez un père et son fils, tous deux atteints d'une anémie hémolytique bien compensée (56). La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase avait une activité comprise entre 20 et 30 % des valeurs normales.

Les modifications biochimiques observées dans les hématies des ma-

lades ont été trouvées voisines de celles obtenues en présence d'un inhibiteur de l'enzyme.

Les caractères physico-chimiques de l'enzyme déficiente n'ont pas été étudiés, ce qui rend impossible de dire si le déficit enzymatique est dû à la diminution de l'enzyme ou à la production d'une molécule structuralement anormale.

La transmission génétique n'est pas connue.

2 , 3 - D I P H O S P H O G L Y C E R O M U T A S E

Nomenclature : E.C. 2.7.5.4.

1,3-diphospho-D-glycérate : 3-phospho-D-glycérate phospho-
transférase

Abréviation : DPGM

Réaction :

1,3-diphosphoglycérate $\xrightarrow{\text{DPGM}}$ 2,3-diphosphoglycérate

Déficit : Quelques cas

Clinique : Hémolyse légère

Génétique : Transmission autosomique récessive (?)

La diphosphoglycéromutase, mise en évidence pour la première fois en 1950, par RAPOPORT et LUEBERING (311), transforme le 1,3-diphosphoglycérate en 2,3-diphosphoglycérate dont le rôle biochimique très particulier a déjà été exposé.

Jusqu'à ces derniers temps, le déficit en DPGM était difficile à affirmer parce que l'activité de l'enzyme n'était généralement pas mesurée directement. La plupart des observations rapportées s'appuyaient sur la diminution du taux de 2,3-diphosphoglycérate (3 - 235 - 305 - 340), mais les déficits en triose-phosphate-isomérase et en glycéraldéhyde-3-phosphate-deshydrogénase entraînent également un abaissement du taux du 2,3-diphosphoglycérate. Ce critère est donc insuffisant.

En raison de ces difficultés, le déficit en DPGM a été parfois assimilé au monstre du Loch Ness de l'enzymologie !... mais SCHROTER et KALINOWSKI (341) ont décrit récemment une méthode de mesure directe de l'enzyme mettant en oeuvre une chaîne de réactions enzymatiques allant du fructose-1,6-diphosphate au 2,3-diphosphoglycérate, la vitesse du système étant limitée par l'activité de la DPGM.

Deux observations utilisant la mesure directe de l'enzyme sont connues. L'une émane de SCHROTER (339) et concerne un nouveau-né atteint d'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire. Les parents consanguins sont porteurs d'un déficit de l'enzyme atteignant 50 % environ. En l'absence de toute anomalie clinique et hématologique, ils ont été classés hétérozygotes et l'enfant présumé homozygote.

L'autre observation, rapportée tout récemment (mars 1970) en France par LABIE et Coll. (217), traduit un déficit familial atteignant 30 % découvert par hasard chez un "témoin" qui présente une discrète tendance à l'hémolyse accompagnée d'une petite polyglobulie. Une attention particulière a été portée à l'étude de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène qui a été trouvée abaissée ; les auteurs suggèrent que la baisse d'oxygénation des tissus périphériques qui en découle pourrait stimuler l'érythropoïèse et expliquer la polyglobulie observée.

L'authenticité du déficit en DPGM apparaît désormais assurée, et sa transmission être celle d'un caractère autosomique récessif.

Signalons enfin que des connaissances nouvelles concernant les propriétés physico-chimiques de l'enzyme ont été apportées par ROSE (321). Il démontre en particulier le caractère inhibiteur compétitif du 2,3-diphosphoglycérate vis-à-vis du 1,3-diphosphoglycérate.

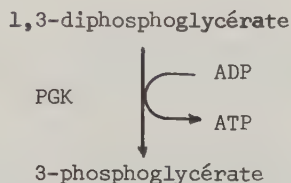
P H O S P H O - G L Y C E R A T E - K I N A S E

Nomenclature : E.C. 2.7.2.3.

ATP : 3-phospho-D-glycérate-1-phosphotransférase

Abréviation : PGK

Réaction :



Déficit : 2 observations

Clinique : Hémolyse sévère

Génétique : Transmission liée au chromosome X (?)

La phosphoglycératekinase catalyse la conversion du 1,3-diphosphoglycérate avec production d'ATP.

Jusqu'à ce jour, 2 observations de déficit ont été rapportées.

L'une en 1968, due à KRAUS et Coll. (212) est peu convaincante ; il s'agit d'un déficit modéré chez une femme porteuse d'une anémie hémolytique congénitale chronique, non améliorée par la splénectomie.

La deuxième observation, décrite par VALENTINE et Coll.(381) en 1969, fait l'étude de 25 membres d'une grande famille chinoise. Une anémie hémolytique non sphérocytaire, sévère, accompagnée d'une forte réticulocytose est trouvée chez deux hommes pour lesquels l'activité de la PGK est très faible ou nulle - et des anémies d'intensité variable atteignent quatre femmes. Le déficit est retrouvé dans les leucocytes.

Les données du déficit observées chez les femmes et la filiation

héréditaire semblent en tous points comparables à celles observées dans le déficit en glucose-6-phosphate deshydrogénase, ce qui est en faveur d'une transmission héréditaire en liaison avec le chromosome sexuel X. Signalons que l'étude d'un nouveau déficit, actuellement en cours d'exploration, ne semble pas retrouver cette hypothèse (229).

Quant au mécanisme de l'hémolyse, il reste partiellement inexpliqué. La concentration en ATP est diminuée, mais la glycolyse devrait pouvoir se faire en empruntant le cycle de Rapoport-Luebering.

Les observations à venir prouveront vraisemblablement l'hétérogénéité du déficit, l'enzyme ayant été récemment séparée par électrophorèse (30).

P H O S P H O - G L Y C E R A T E - M U T A S E

Nomenclature : E.C. 2.7.5.3.

2,3-diphospho-D-glycérate : 2-phospho-D-glycérate phospho-
transférase

Abréviation : PGM

Réaction (78) :

3-phospho-glycérate

PGM



2-phospho-glycérate

Déficit : Inconnu

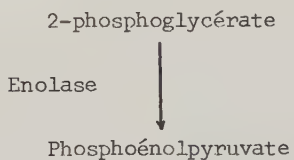
E N O L A S E

Nomenclature : E.C. 4.2.1.11.

Phosphopyruvate hydratase:

2-phospho-D-glycérate hydro-lyase

Réaction :



Déficit : Inconnu

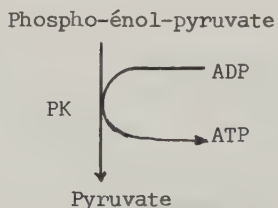
P Y R U V A T E - K I N A S E

Nomenclature : E.C. 2.7.1.40

ATP : pyruvate phosphotransférase

Abréviation : PK

Réaction :



Déficit : Le plus fréquent après le déficit en G.6 PD

Clinique : Hémolyse sévère

Génétique : Transmission autosomale récessive

- La pyruvate kinase physiologique.

La pyruvate kinase catalyse une étape irréversible de la glycolyse qui correspond à une importante dénivellation énergétique. Elle permet la régénération de l'ATP.

La mise en évidence récente de propriétés allostériques (95) montre qu'elle constitue un système régulateur très efficace de la glycolyse érythrocytaire ; des formes interconvertibles existent, l'une de cinétique michaelienne PK-B, l'autre de cinétique allostérique PK-A.

Selon CARTIER (87) on a de multiples raisons de penser que la vitesse de la PK est réglée par la concentration en ATP qui la ralentit et par un substrat formé au niveau de la phosphofructokinase, le fructose-diphosphate qui l'active. L'accumulation d'ATP inhibe la phosphofructokinase et diminue le fructose diphosphate, au contraire la baisse d'ATP li-

bère la phosphofructokinase qui forme du fructose diphosphate : dans les deux cas, ces variations modulent très efficacement la vitesse du système pyruvate kinase (174 - 402).

La PK est présente dans la plupart des tissus, sous l'aspect d'isoenzymes différentes (46 - 135 - 210) ; en 1964, KOLER et Coll. (210) ont montré des différences importantes (mobilité électrophorétique, K_m vis-à-vis du phospho-énol-pyruvate, volume d'élution sur DEAE cellulose) entre les pyruvate-kinases érythrocytaire et leucocytaire.

La constante de Michaelis pour le phospho-énol-pyruvate (K_m PEP) de l'enzyme leucocytaire est voisine de celle de l'enzyme musculaire et indépendante de la concentration en ADP. Au contraire, la K_m PEP de la PK érythrocytaire est environ dix fois inférieure à celle des leucocytes et du fait d'une inhibition compétitive dépend largement de la concentration en ADP.

Déterminée chez cinq sujets normaux à partir d'une préparation de pyruvate kinase érythrocytaire purifiée par adsorption sur DEAE-cellulose et précipitation au sulfate d'ammonium, la K_m PEP trouvée par BOIVIN et GALAND (59) varie de 1,25 à $1,61 \times 10^{-3}$ mM.

On ne sait pas encore avec certitude s'il existe une ou plusieurs pyruvate kinases dans le globule rouge (95). BIGLEY (46) étudiant la répartition de l'enzyme dans les tissus décrit trois isoenzymes différentes appelées PK I, PK II, PK III. L'isoenzyme I est présente dans le foie et les hématies, l'isoenzyme II dans le rein, l'isoenzyme III dans le foie, le rein, le tissu musculaire, le cerveau et les leucocytes.

Ces différences font présumer que des mécanismes génétiques différents président à la synthèse de l'enzyme dans les globules rouges et les globules blancs, et expliquent que, dans les cas de déficit en PK, l'enzyme des globules blancs soit habituellement normal (54).

Les insuffisances qui entourent les propriétés de la PK provien-

nent essentiellement de la grande labilité de l'enzyme, ce qui en rend la purification difficile (124 - 304) et ne permet guère la comparaison des résultats des différents auteurs.

- Le déficit en pyruvate kinase.

Fréquence :

Le déficit en PK est, par sa fréquence relative, la deuxième érythroenzymopathie importante. Actuellement, plus d'une centaine de cas ont été décrits ou signalés dans la littérature et la maladie n'est plus systématiquement publiée (18 - 48 - 90 - 104 - 245 - 370 - 371 - 387). Elle a été décrite pour la première fois en 1961 par TANAKA et VALENTINE (371-384) et touche les deux sexes de façon égale.

Clinique et hématologie :

Les manifestations cliniques sont très variables ; elles se révéleront le plus souvent au cours de la première enfance, mais aussi à l'adolescence ou à l'âge adulte (18 - 54).

L'ictère hémolytique néonatal est signalé dans près de la moitié des cas ; à cet âge l'hémolyse peut être très sévère et nécessiter une splénectomie.

Tous les intermédiaires existent entre l'anémie hémolytique sévère révélée à la naissance et les formes bénignes longtemps compensées et découvertes tardivement.

Les manifestations hématologiques sont celles d'une hyperhémolyse.

La numération des globules rouges oscille entre 2 et 4 millions par mm^3 ; les hématies présentent assez fréquemment quelques anomalies morphologiques : macrocytes, ovalocytes et surtout cellules à spicules évoquant une acanthocytose.

La réticulocytose, toujours très accentuée, est la règle. Elle peut atteindre 30 à 50 % et même plus chez les sujets splénectomisés.

La résistance osmotique des hématies est normale avant incubation; mais leur durée de vie déterminée par épreuve isotopique se trouve généralement très diminuée. Dans une observation rapportée par OSKI (285 - 286) la demi-vie des hématies marquées au Cr 51 était de 0,7 jour, 2,9 jours et 2 jours pour une durée de vie normale de 28 jours par cette méthode. Cependant, il est aussi des cas chez l'adulte où la durée de vie est peu différente de la normale.

La splénomégalie est un signe constant ; il est maintenant admis que l'ablation de la rate améliore nettement l'état de certains malades (54).

Enfin quelques anomalies osseuses ont été signalées (48 - 54) : crâne volumineux, saillie des bosses frontales, affaissement de la base du nez. CARTIER et Coll. décrivent le cas d'une lithiase vésiculaire due à la persistance de l'hémolyse.

Le pronostic du déficit ne semble pas très mauvais, sauf peut-être dans les premières années de la vie. Plus tard, l'hémolyse tend à se stabiliser.

Aspects biochimiques :

L'hétérogénéité des déficits en PK paraît assez vraisemblable. Un point capital est l'absence presque constante de parallélisme entre la diminution de l'activité enzymatique et l'atteinte clinique. Le dépistage des hétérozygotes est possible, mais en raison de la grande variabilité de l'activité de l'enzyme, il existe un chevauchement entre les valeurs mesurées chez les hétérozygotes et les homozygotes d'une part, les hétérozygotes et les sujets normaux d'autre part. Les hétérozygotes sont cliniquement sains.

L'interprétation rigoureuse des mesures d'activité, et plus encore des caractères qualitatifs de l'enzyme, est rendue très difficile dans la majorité des cas en raison du taux très important de réticulocytes.

Par rapport à des cellules de même âge, les globules rouges déficients en PK sont appauvris en ATP, et l'activité glycolytique est trouvée diminuée (90).

Les modifications de la glycolyse au cours du déficit ont été très bien étudiées par CARTIER et Coll. (92). Selon ces auteurs, la diminution d'ATP retentit sur l'activité de l'hexokinase, dans le sens d'un ralentissement explicable par la valeur de la K_m ATP de l'hexokinase qui se situe dans la zone de concentration normale de l'ATP intracellulaire.

La baisse d'activité de l'hexokinase entraîne une diminution des hexoses-phosphates et des trioses-phosphates.

Au contraire, la faible activité de la PK se traduit par une accumulation des métabolites du glucose en amont jusqu'à la dérivation du 2,3-diphosphoglycérate.

Signalons à ce sujet que plusieurs auteurs considèrent l'augmentation du 2,3-diphosphoglycérate comme un caractère biochimique majeur de l'enzymopathie. Pour CARTIER, cette augmentation est seulement la conséquence de la très forte réticulocytose.

L'étude qualitative des enzymes de sujets déficitaires n'en est encore qu'à ses débuts. La question posée est la suivante : ou bien les PK des sujets déficients ont des propriétés identiques à celles des enzymes normales, ou bien les enzymes sont anormales (60).

Le critère le plus souvent retenu jusqu'alors pour établir cette distinction est la détermination de la K_m PEP dont la cinétique a toujours été trouvée michaelienne dans les hémolysats normaux, tandis que la même

détermination à partir de préparations purifiées de l'enzyme conduit à des résultats très divergents selon les auteurs.

Après purification, CAMPOS et Coll. (81) obtiennent chez 3 sujets déficitaires des Km PEP identiques à celles des sujets normaux ; il n'en est pas de même pour WALLER et LOHR (393), WISMAN et TONZ (400), BOIVIN et GALAND (59), OSKI et BOWMAN (285) qui trouvent des Km PEP tantôt élevées, tantôt abaissées. Selon BOIVIN (65) et FAGLIA (292), ces différences plaident en faveur de l'existence de divers types d'anomalies moléculaires héréditairement transmises.

De leur côté, CARTIER et Coll. (90) affirment que la PK partiellement purifiée existe dans le globule rouge qu'il soit normal ou déficient, sous deux formes interconvertibles : une PK B à cinétique michaélienne et insensible au fructose-diphosphate ; une PK A à cinétique allostérique et même vitesse maximum, capable de retrouver en présence de fructose diphosphate une cinétique de même type que la PK B avec la même Km PEP.

Ainsi selon CARTIER, l'existence de ces deux formes explique probablement la variabilité des Km PEP relevées dans la littérature, et pour cet auteur l'hypothèse d'une modification moléculaire de l'enzyme chez certains malades reste à démontrer.

Comme on le voit, il est actuellement encore impossible de répondre formellement à cette question, la structure moléculaire de l'enzyme normal et ses systèmes d'activation et d'inhibition n'étant qu'imparfaitement connus.

Il est toutefois tentant d'imaginer pour le déficit en PK une hétérogénéité analogue à celle des déficits en G-6 PD, mais ce n'est encore qu'une hypothèse que seules des études biochimiques plus précises et plus nombreuses viendront confirmer ou infirmer.

Génétique :

La tare se transmet comme un caractère mendélien autosomique récessif. A l'exception d'une observation, le déficit a toujours été trouvé localisé aux érythrocytes.

La fréquence de l'apparition de la tare augmente avec la consanguinité ; à l'exception de quelques observations isolées, la maladie a été décrite surtout chez les Européens.

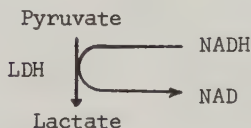
L A C T I C O - D E S H Y D R O G E N A S E

Nomenclature : E.C. 1.1.1.27.

L.Lactate : NAD-oxydoréductase

Abréviation : LDH

Réaction :



Déficit : Inconnu

Catalyseur de la dernière étape de la voie anaérobie d'Embden-Meyerhof, la lactico-deshydrogénase transforme l'acide pyruvique en acide lactique.

Elle ne présente que peu d'intérêt dans la pathologie enzymatique du globule rouge, puisqu'aucun déficit n'a été décelé.

Ceci mis à part, et bien qu'on ait démontré depuis 1950 que de très nombreuses enzymes possédaient des formes moléculaires multiples, les isoenzymes de la LDH sont encore de beaucoup les mieux connues (334).

Par électrophorèse, cinq fractions ont été séparées ; elles sont formées par l'assemblage au hasard de quatre subunités de deux types, de poids moléculaire identique, mais de charge différente (213). La répartition de ces isoenzymes varie selon l'espèce et surtout l'organe et le tissu ; leur étude dans le globule rouge a montré son intérêt en génétique humaine et en biologie moléculaire.

SCHAPIRA (334), puis STARKWEATHER (365), ont mis en évidence quatre isoenzymes dans les hématies jeunes et deux seulement dans les globules âgés ; STARKWEATHER a également examiné les isoenzymes de la LDH au cours

de différentes affections hématologiques et a essentiellement observé des variations d'une isoenzyme. Cette dernière est augmentée dans toutes les circonstances où l'érythropoïèse est très active et la réticulocytose élevée : anémies hémolytiques, thalassémies, drépanocytoses.

En réalité, les variations de la teneur relative en isoenzymes de la LDH reflètent les différentes phases de l'érythropoïèse et pour SCHAPIRA cette connaissance peut constituer un utile moyen d'évaluer l'âge des érythrocytes et visualise à l'échelon moléculaire le phénomène de vieillissement des activités enzymatiques du globule rouge.

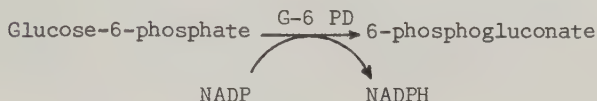
GLUCOSE - 6 - PHOSPHATE DESHYDROGENASE

Nomenclature : E.C. 1.1.1.49.

D-Glucose-6-Phosphate : NADP oxydoréductase

Abréviation : G-6 PD

Réaction :



Déficit : Le plus fréquent

Clinique : -Accès hémolytique aigu provoqué

-Favisme

-Anémie hémolytique chronique

Génétique : Transmission héréditaire récessive liée au chromosome X

Le déficit en G-6 PD est de loin la plus fréquente des érythroenzymopathies. Il est aussi le plus étudié et le mieux connu, tant du point de vue clinique que biochimique (67 - 123 - 125).

Les plus intéressantes des notions acquises récemment sont d'ordre biochimique et comprennent l'isolement de l'enzyme normale (405) et la description de nombreuses variantes (66).

- La G-6 PD physiologique.

L'enzyme la plus répandue dans les diverses races humaines est nommée variante B (+) normale.

Les caractéristiques de la protéine enzymatique ont été définies à partir d'enzymes imparfaitement purifiées par KIRKMAN (206), CHUNG et LANGDON (99), puis à partir de l'enzyme obtenue cristallisée en 1966 par YOSHIDA (403).

L'enzyme est un hexamère de poids moléculaire 240.000 formé de six subunités identiques ou très voisines ; chaque sous-unité serait liée à une molécule de NADP. Par dilution la molécule se dissocierait d'abord en deux trimères peu actifs.

En 1967, le même auteur (404) a pu montrer que le type B (+) normal ne différait du type A (+), variante du sujet noir, que par le simple remplacement de l'asparagine du type B (+) par l'acide aspartique. Cette substitution est d'ailleurs en accord avec la réaction de migration électrophorétique.

La G-6 PD a été décelée dans de nombreuses cellules car beaucoup de tissus utilisent la voie des pentoses comme source de NADPH : leucocytes, thrombocytes, hépatocytes, cellules de la cortico-surrénale, de la peau, du cristallin et aussi dans la salive (123).

L'enzyme semblait être de même nature dans tous les tissus, mais des travaux récents mettant à profit des méthodes immunologiques auraient différencié l'enzyme hépatique de l'enzyme érythrocytaire.

Un certain nombre de propriétés de l'enzyme normale ont été codifiées par la Commission de Nomenclature de l'Organisation Mondiale de la Santé (278) en 1967 :

- activité de l'enzyme dans les hémolysats
- mobilité électrophorétique
- affinité de l'enzyme pour le glucose-6-phosphate
- affinité de l'enzyme pour la coenzyme NADP
- affinité de l'enzyme pour les analogues structuraux du substrat
- activité de l'enzyme en fonction du pH
- thermostabilité de l'enzyme

La détermination de ces propriétés chez les sujets déficients a permis de démontrer l'hétérogénéité moléculaire de l'affection, et assure

une certaine standardisation entre les travaux.

- Le déficit en G-6 PD.

Fréquence (24) :

La fréquence générale du déficit ne peut être exactement mesurée, mais elle est assurément grande. On estime à plus de 100 millions le nombre de sujets atteints dans le monde.

Initialement considéré comme localisé à la race noire, où il est présent dans le Centre Africain chez plus du quart de la population, le déficit est plus sûrement ubiquitaire (47 - 142 - 219 - 260).

La déficience existe dans toutes les ethnies blanches et sa fréquence a été estimée à une moyenne de 0,1 % pour l'ensemble de la population européenne ; le taux varie notablement avec les zones géographiques et il convient d'établir une distinction entre les populations d'Europe septentrionale et occidentale d'une part, les populations d'Europe méridionale, des rivages méditerranéens au Proche-Orient d'autre part.

En Europe septentrionale et occidentale, le déficit est tout à fait exceptionnel. Il est grave et s'exprime le plus souvent sous forme d'une anémie hémolytique chronique.

En France, quelques cas autochtones ont été décrits (66 - 67 - 123) ; nous rapporterons l'étude biochimique d'observations nouvelles.

Clinique et hématologie.

Historiquement, c'est l'anémie induite chez les Noirs par la Primaquine(8-aminoquinoléine), antipaludéen de synthèse, qui est à l'origine des recherches qui ont abouti à la découverte du déficit enzymatique.

Comme il a été dit au début de ce travail, l'observation fondamentale est le fait de CARSON (33) qui démontra le déficit en 1956. BEUTLER en 1955 avait observé la baisse constante du glutathion réduit.

Tout déficit en G-6 PD freine la voie biochimique de Warburg-Dickens-Horecker. Cela, comme nous l'avons vu au chapitre I, est sans grande importance sur le métabolisme glucidique proprement dit.

En temps ordinaire, le sujet déficient fabrique quand même assez de G-6 PD, du moins chez le Noir, pour assurer la marche à minima du cycle du glutathion. Mais cet équilibre est précaire : la moindre perturbation, sous forme d'apport toxique divers, le rompt.

Les manifestations cliniques du déficit se traduisent essentiellement par une anémie hémolytique, dont plusieurs formes sont décrites (123):

- L'anémie hémolytique aiguë (23 - 123).

C'est d'abord la forme du sujet de race noire ; elle se définit par le caractère provoqué de la crise hémolytique, en général par des médicaments (32 - 83 - 203 - 248 - 250).

L'histoire clinique comprend trois épisodes successifs, soit une phase d'hémolyse aiguë qui s'installe environ deux jours après l'absorption du toxique et atteint son maximum vers le huitième jour, puis une phase de récupération avec correction de l'anémie et enfin une phase d'équilibre de deux à trois mois. L'emploi de Fe 59 a permis de montrer que seules les hématies les plus âgées sont détruites, ce qui explique que l'hémolyse cesse spontanément même si l'absorption de la cause déclenchante est poursuivie.

L'anémie hémolytique aiguë du sujet de race blanche ressemble dans ses grandes lignes à celle du Noir, mais elle serait plus grave. Cette différence résulte vraisemblablement du caractère plus marqué du déficit et de

causes déclenchantes plus nombreuses : médicaments (32 - 203 - 248), végétaux (125 - 326), infections bactériennes et virales (125).

L'enzymopénie semble potentialiser le pouvoir hémolytique minime qui existe dans de nombreux médicaments (32) ; il faut aussi noter que certains végétaux ne s'avèrent hémolytiques que s'ils sont consommés crus ou insuffisamment cuits (125).

Parmi les causes d'accès hémolytique, il faut faire une place particulière à l'ingestion de fèves et signaler que tous les sujets déficients en G-6 PD ne sont pas forcément sensibles aux fèves ; le favisme (326-328) comporterait donc un facteur surajouté, peut-être de nature immunologique.

- L'anémie hémolytique chronique.

Elle est beaucoup plus rare et n'a fait l'objet que d'une cinquantaine d'observations, presque toutes rapportées chez des sujets de race blanche (22 - 25 - 71 - 82 - 100 - 148 - 171 - 234 - 236 - 263 - 307 - 373 - 394). L'anémie est permanente mais modérée ; elle peut subir des accès hémolytiques aigus. Sa date d'apparition est variable, parfois dès la naissance. La durée de vie des hématies marquées au Cr 51 est habituellement diminuée.

Citons encore l'ictère hémolytique néonatal sans incompatibilité foeto-maternelle (70 - 72 - 120), particulièrement fréquent en Grèce (121-122 - 136) et en Italie (143 - 144) qui est attribué à un déficit transitoire en G-6 PD. Cette forme est pour le moins discutable puisque tous les nouveaux-nés déficients sont loin de faire une hémolyse néo-natale, et que l'activité de la G-6 PD à la naissance se trouve très augmentée (186 % de la G-6 PD adulte dans le sang du cordon selon nos résultats).

Aspects biochimiques

- Variations quantitatives.

Comme c'est le cas pour le déficit en pyruvate-kinase, il ne semble pas y avoir de corrélation étroite entre le pourcentage d'activité de la G-6 PD et la gravité des manifestations cliniques.

L'activité chez le sujet noir déficient varie de 20 à 25%, tandis que le sujet blanc ne conserve que 2 à 15 % de l'activité normale (250). Le déficit enzymatique du Blanc est d'ailleurs non seulement plus profond, mais aussi plus diffus puisqu'il s'observe également dans les leucocytes et les plaquettes (68 - 69 - 117 - 327).

Enfin les taux retrouvés chez les porteurs hétérozygotes, s'ils sont fréquemment voisins de 50 %, peuvent varier dans de très larges limites allant du déficit grave aux valeurs normales (67).

- Variations qualitatives.

Si les variations quantitatives des sujets hétérozygotes sont un objet de recherches pour les généticiens, ce sont les variations qualitatives de l'enzyme qui passionnent les biochimistes. Les travaux qui ont abouti à l'identification précise de nombreux types d'hémoglobines ont créé un modèle pour l'étude des variantes des protéines humaines. La G-6PD est la première à bénéficier largement de cet exemple.

Une quarantaine de variantes ou isoenzymes ont été jusqu'ici isolées. Selon les vœux de la Commission de Nomenclature de l'Organisation Mondiale de la Santé (278) leur définition est basée sur la détermination de critères d'appréciation précédemment énoncés. Malheureusement, ces divers critères d'identification n'ont pas été tous déterminés dans chaque cas, et leurs valeurs normales sont susceptibles de variations d'un laboratoire à l'autre. Il en résulte que des variantes décrites par des auteurs différents sont probablement identiques.

Les propriétés de chacune des variantes actuellement connues ont fait l'objet de revues récentes (66 - 207 - 278). Celles des variantes normales et des variantes mises à jour lors de déficits liés à une anémie hémolytique congénitale, figurent au Tableau 15.

En l'absence d'une définition chimique irréfutable, leur classement ne peut être qu'arbitraire ; deux modalités sont employées : une classification biochimique basée sur l'activité de l'enzyme (normale, faible, augmentée), une classification clinique selon la nature des manifestations hématologiques (sans anomalies, avec hémolyse aiguë médicamenteuse ou néonatale, au cours d'anémies hémolytiques congénitales non sphérocytaires).

En France, en dehors de la variante normale B (+) des sujets normaux, les déficits répondent à la variante B (-) méditerranéenne chez des sujets originaires du sud de l'Italie ou d'ascendance israélienne, et à la variante A (-) chez les sujets de race noire.

Mais il existe un certain nombre d'isoenzymes autochtones différentes des précédentes, révélées soit par une hémolyse d'origine médicamenteuse, soit, comme c'est le cas pour nous, par une anémie hémolytique chronique congénitale non sphérocytaire.

Le nombre des variantes, déjà découvertes, porteuses d'altérations chimiques de la molécule implique autant d'altérations du gène de structure de la G-6 PD. Selon DREYFUS (123), il est un des témoins de la prédominance très probable des lésions des gènes de structure sur celles des gènes régulateurs en pathologie humaine.

- Mécanisme de l'hémolyse.

L'activité des enzymes de la glycolyse est normale chez les malades, et le déficit en G-6 PD ne provoque pas de méthémoglobinémie (35 - 407 408).

La première conséquence du déficit est l'insuffisance de génération du NADPH, lequel est avant tout utilisé par l'hématie à la réduction du glutathion oxydé. Mais l'instabilité du glutathion réduit des sujets déficients ne suffit pas à expliquer l'hémolyse puisqu'on connaît des sujets à taux de glutathion réduit très faible qui ne présentent que des accidents bénins. JACOB et JANDL (187) ont montré que ce n'était pas tellement l'inhibition du glutathion réduit que celle des groupes sulfhydryles de la membrane cellulaire qui pouvait être responsable de l'hyperhémolyse. Ceci pourrait expliquer la baisse de l'hexokinase lors du déficit en G-6PD évoquée par certains auteurs.

En définitive, le déficit en G-6 PD retentit certainement, par l'insuffisance de génération du NADPH au niveau des systèmes oxydo-réducteurs, sur la détoxication des peroxydes qui seraient formés sous l'influence des agents toxiques.

En dépit de ces hypothèses, le mécanisme exact de l'hémolyse reste obscur.

- Génétique.

La transmission héréditaire de la tare comme liée au chromosome sexuel X est bien démontrée (29 - 98). Elle s'effectue selon le mode récessif : les sujets de sexe masculin sont soit normaux, soit totalement déficitaires, alors que les sujets de sexe féminin sont soit normaux, soit déficitaires, mais le déficit a une expression d'importance variable, le plus souvent intermédiaire.

Pour expliquer les variations d'activité de la G-6PD observées d'un cas à l'autre chez les femmes hétérozygotes, BEUTLER et Coll. (44) exploitant l'hypothèse de LYON (242) postulèrent que la femme est une mosaïque composée de deux populations cellulaires, l'une ayant un X actif, alors que l'autre population aurait un chromosome X inactif.

DREYFUS et KAPLAN (198) ont apporté une confirmation directe à cette hypothèse en mesurant à l'échelon cellulaire l'activité de la G-6PD.

La position du locus responsable de la synthèse de la G-6PD sur le chromosome X est maintenant connue avec assez de précision. Il serait assez voisin du gène déterminant le facteur sanguin Xg (a), mais aussi des gènes responsables du daltonisme et de l'hémophilie A.

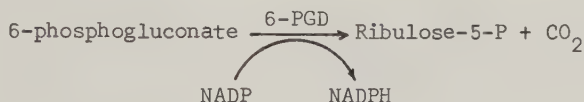
6 - P H O S P H O G L U C O N A T E D E S H Y D R O G E N A S E

Nomenclature : E.C.1.1.1.44.

6-phospho-D-gluconate : NADP oxydoréductase

Abréviation : 6-PGD

Réaction :



Déficit : Très rare

Clinique : Asymptomatique (?)

Génétique : Caractère autosomal dominant (?)

Contrairement à la G-6PD, la 6-phosphogluconate deshydrogénase a été peu étudiée jusqu'à ce jour, à l'exception de ses propriétés électrophorétiques qui permettent de distinguer huit types. L'étude de la répartition de ces différentes variétés trouve une application intéressante en anthropologie (320 - 356).

D'après ces travaux, la 6-PGD apparaît sous forme d'un dimère constitué de deux chaînes identiques et possédant deux sites actifs (315).

Les déficits en 6-PGD sont rares et de découverte récente ; leur incidence en hématologie reste à préciser.

Deux cas ont été publiés, d'une part par PARR et FITCH (295), d'autre part par BREWER et DERN (77), de familles présentant un déficit. Dans les deux familles, les sujets atteints avaient un taux d'activité environ à la moitié de la normale. L'un et l'autre auteur admettent qu'il s'agit d'un défaut autosomal dominant. Dans aucun de ces cas, il n'existait de signes d'anémie hémolytique.

En contraste avec ces observations, quatre cas à notre connaissance d'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire, associés à un déficit en 6-PGD, ont été rapportés.

Le moins discutable est dû à SCIALOM et Coll. (346). Il s'agit d'un déficit incomplet trouvé chez un patient splénectomisé et porteur d'une anémie hémolytique ; pour les auteurs, il n'y a pas de lien entre le déficit enzymatique modéré de la voie aérobie du glucose et une anémie hémolytique grave.

COTTE et Coll. rapportent le cas d'un déficit simultané en G-6PD et 6-PGD. L'activité de cette dernière enzyme était évaluée à 40 % de la normale, mais l'association de ce déficit à une tare qui lui est étroitement liée du point de vue métabolique interdit toute conclusion.(108)

Le cas décrit par BOIVIN et Coll. (58) semble constituer la première observation d'une enzymopénie transitoire. Il s'agit d'un déficit acquis et transitoire, primitivement évalué à 15 % de la normale, au cours d'une anémie hémolytique aiguë idiopathique avec thrombopénie. L'activité enzymatique est retrouvée normale après quinze jours....

Dans l'observation de LAUSECKER et Coll. (223), il existait un déficit d'environ 50 % (mesuré par LOHR à TUBINGEN) avec présence de corps de Heinz dans les hématies, une instabilité marquée du glutathion réduit à l'incubation en présence d'acétylphénylhydrazine et une diminution du NADPH. Mais on trouvait aussi de façon paradoxale une baisse d'ATP et de lactate, signes en faveur d'un trouble de la glycolyse anaérobie.

Ce déficit a été infirmé ultérieurement, il a fait récemment l'objet d'une nouvelle étude approfondie entreprise par LOHR et LAZARD et rapportée dans la thèse de ce dernier (226). Il s'agirait en réalité d'une anomalie de la structure du stroma se traduisant par une augmentation d'activité des ATPases.

Pour notre part, grâce à l'obligeance du Docteur LAUSECKER de Colmar, nous avons pu examiner à Nancy en mars 1970 un prélèvement de ce même malade. Nous n'avons retrouvé ni déficit en 6-PGD, ni augmentation de l'ATPase (tableau 3) : la vraie nature de l'anémie hémolytique de ce patient reste à découvrir.

	Malade	Témoin (.)	Valeurs normales
Hématies (millions par mm ³)	3,13	3,16	4,5 à 5
Hématocrite	310/690	310/690	400/600
Réticulocytes %	11,5	13	0,5 à 2
G-6PD (°)	1,86	2,38	1,96 $\pm$ 0,48
6-PGD (°)	1,63	1,52	1,31 $\pm$ 0,23
Glutathion réduit (mg/100 ml GR)	87,4	80,8	80 $\pm$ 20
Stabilité du glutathion (%)	85	83	80 $\pm$ 20
Mg++ - ATPase (°)	3,60	3,80	3,8 $\pm$ 0,3

(°) Activités enzymatiques en U.I./mm/ml GR, pH 7,6, à 25°C

(.) Témoin prélevé et transporté dans les mêmes conditions de Colmar à Nancy.

Tableau 3 : ETUDE BIOCHIMIQUE DE HEI... Alex

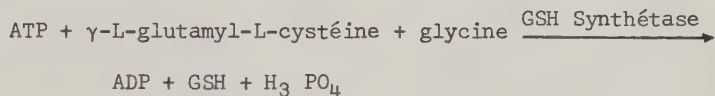
G L U T A T H I O N S Y N T H E T A S E

Nomenclature : E.C. 6.3.2.3.

γ-L-glutamyl-L-cystéine : glycine lyase (ADP)

Abréviation : GSH - synthétase

Réaction :



Déficit : 4 observations

Clinique : Hémolyse modérée

Génétique : Transmission autosomale récessive (?)

Le glutathion est un tripeptide formé de l'acide L-glutamique, de la L-cystéine, et de la glycine. L'emploi d'acides aminés marqués a permis à BOIVIN (55) et à d'autres (186) de montrer que les globules rouges, même adultes, disposaient de systèmes enzymatiques assez complexes pour en réaliser la synthèse. Elle comporte deux étapes : la formation d'un dipeptide glutamylcystéine sous la dépendance d'une glutamyl-cystéine-synthétase, puis celle du tripeptide par fixation de glycine grâce à l'action de la glutathion synthétase. Ces deux enzymes n'ont pas encore été isolées du globule rouge et leurs caractères physico-chimiques sont inconnus.

Le déficit en glutathion réduit est un fait bien connu au cours des déficits en G-6PD. Mais le déficit congénital isolé est rare ; il a été signalé par ZINKHAM et LENHARD (408), puis décrit par OORT et Coll. (282) en 1961. Les mêmes auteurs rapportèrent en 1963 l'existence d'un trouble de la biosynthèse du glutathion dans les hématies de leurs malades(306).

L'étude biochimique approfondie de deux cas observés ultérieurement en France a permis à BOIVIN et Coll. (57 - 62) de fournir des arguments en faveur de l'hypothèse d'un déficit congénital en glutathion syn-

thétase érythrocytaire. En effet, les hématies et les hémolysats des malades synthétisent correctement le dipeptide mais le temps de fixation de la glycine est perturbé. Il est donc prouvé que chez ces malades le défaut porte sur la synthèse du glutathion et non sur sa stabilité.

Les sujets possèdent un taux de glutathion réduit presque nul. L'aspect clinique est celui d'une anémie hémolytique congénitale modérée; elle est stable mais peut subir des poussées sous l'influence de médicaments. La durée de vie des hématies est diminuée.

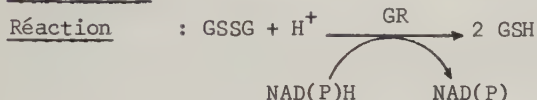
Il faut noter que les activités enzymatiques considérées comme sensibles à la diminution des groupements thiols sont normales, de même que le taux de méthémoglobine. Cela tendrait à démontrer que le rôle du glutathion dans la réduction de la méthémoglobine et le maintien de certaines activités enzymatiques a été surestimé.

G L U T A T H I O N R E D U C T A S E

Nomenclature : E.C.1.6.4.2.

NAD (P) H : glutathion oxydoréductase

Abréviation : GR



Déficit : Environ 100 cas (Allemagne)

Clinique : Signes polymorphes hématologiques et neurologiques

Génétique : Caractère autosomique dominant

Le glutathion-réductase est l'enzyme clé de la régulation du métabolisme de la voie des pentoses dans les hématies.

Comme pour les diaphorases, on considère classiquement qu'il existe une GR spécifique au NAD et une spécifique au NADP. Mais les travaux d'ICEN (183) mettent en doute l'existence de deux enzymes et affirment qu'une seule GR peu spécifique agirait indifféremment en présence de NADP ou de NAD.

L'extraordinaire stabilité de l'enzyme (plusieurs semaines à +4°C) a permis d'en bien étudier les propriétés physico-chimiques (4 - 252). L'enzyme aurait une structure flavoprotéique, dont le groupement prosthétique serait le flavine-adénine-dinucléotide (FAD) (33 - 43).

L'électrophorèse conduite sur acétate de cellulose par BLUME et Coll. (51), et sur gel d'amidon par KAPLAN (194) sépare deux isoenzymes. Les deux bandes, GR I et GR II, présentent une mobilité identique dans les hémolysats et les leucolysats ; l'électrophorèse a aussi permis à KAPLAN de montrer que l'activité enzymatique vis-à-vis de deux nucléotides pyridiniques réside bien dans la même molécule.

Des modifications de l'activité de la GR ont été rapportées dans de multiples circonstances ; elle a été trouvée augmentée associée au déficit en G-6PD, au cours des états diabétiques, de la goutte, après administration d'acide nicotinique, etc... (31 - 33 - 43).

Le premier cas de déficit a été rapporté en 1961 par CARSON et Coll. (84) chez un sujet présentant un tableau clinique d'intolérance à la Primaquine.

Depuis 1962, les auteurs allemands et en particulier LOHR (237 - 239) ont découvert près d'une centaine de cas. Cette fréquence fait de ce déficit le troisième en Europe derrière les déficits en G-6PD et en pyruvate kinase. La déficience a été associée à des états cliniques polymorphes : anémie hémolytique aiguë médicamenteuse, anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire, syndrome rassemblant des modifications hématologiques diverses et des troubles neurologiques. C'est cette dernière forme qui a été fréquemment décrite en Allemagne (50 - 215 - 267 - 390 - 391).

Les anomalies hématologiques comportent tantôt une thrombopénie, tantôt une leucopénie, et même une pancytopenie - en plus de l'anémie hémolytique. Pour les signes neurologiques, le polymorphisme n'est pas moins grand : signes pyramidaux, oligophrénie, et des troubles de l'électro-encéphalogramme constants.

Le déficit a aussi été rapporté associé à des hémoglobinopathies (hémoglobinoase C, α -thalassémie) (392).

Cette grande variété de désordres cliniques, apparemment sans relation avec le déficit, a fait écrire tout récemment à BEUTLER (33) que la baisse d'activité de l'enzyme pourrait représenter une modification secondaire d'un désordre primitif non encore identifié. Cette hypothèse a le mérite d'élargir le débat et aussi l'étendue des recherches. Il est en effet curieux que la maladie sous sa forme polymorphe n'ait été jusqu'ici observée que par les auteurs allemands. Il nous faut rappeler ici les altéra-

tions enzymatiques secondaires observées au cours d'hémopathies acquises et qui pourraient peut-être intéresser la GR d'autant plus que la présence du déficit exposerait particulièrement à l'évolution vers la leucémie aiguë.

Du point de vue biochimique, les choses sont plus simples mais non moins passionnantes. Dans presque tous les cas, le déficit est de l'ordre de 50 %, et atteint également les leucocytes et les plaquettes ; le taux de glutathion réduit est le plus souvent normal et l'incubation des hématies en présence d'acétylphénylhydrazine fait apparaître de nombreux corps de Heinz. La tare se transmet selon le mode autosomique dominant.

EIFLER et Coll. (129), puis LOHR et Coll. (239) ont démontré à partir de GR purifiée de sujets déficients, des perturbations qualitatives de l'enzyme portant sur la constante de Michaelis vis-à-vis du glutathion oxydé et la courbe d'activité en fonction du pH. Ces anomalies n'ont pas été retrouvées par STAAL et Coll. (362), dans leur étude d'un sujet déficient, mais le FAD de l'enzyme de leur patient possède une affinité diminuée envers l'apo-enzyme.

Les acquisitions de portée nouvelle sont le résultat des travaux de BAMJI (10), STAAL et Coll. (361 - 363 - 364) et surtout de BEUTLER (31-33). Ce dernier a montré que les hématies des sujets normaux ne sont pas saturées en coenzyme FAD. Il a eu le mérite de mettre en évidence *in vitro*, puis *in vivo*, l'effet activateur du FAD sur l'enzyme. Ces expériences prouvent par la même occasion que la mesure de l'activité enzymatique de la GR d'un hémolysat dans les conditions habituelles représente seulement une partie de l'activité disponible.

BEUTLER a également démontré que l'activité de base de la GR des individus normaux est directement liée à l'apport alimentaire en riboflavine. STAAL et Coll. (362) pour leur part ont rapporté l'activation par le

FAD d'une enzyme partiellement purifiée, obtenue chez un patient atteint d'un déficit héréditaire en GR ; et bien plus, l'administration de flavine mononucléotide à cet individu durant plusieurs semaines se traduit par l'augmentation de l'activité enzymatique.

Signalons toutefois que la stimulation de la GR d'hémolysats normaux n'a pas été retrouvée par GLATZLE et Coll. (156).

Selon BEUTLER, l'activation de l'activité enzymatique intervient si rapidement après l'administration de riboflavine qu'il faut envisager l'existence d'un précurseur de l'enzyme. Un phénomène d'activation semblable a déjà été signalé en 1968, pour les transaminases activées par la pyridoxine, par JACOBS et Coll. (188).

Tous ces travaux appellent des questions essentielles : l'alimentation est-elle trop pauvre en riboflavine ? Une partie des nombreux déficits localisés en Allemagne serait-elle due à l'utilisation de méthodes de mesure n'estimant que partiellement l'activité de l'enzyme ? Ils apportent également une certitude : il convient d'être très prudent dans les affirmations concernant ce déficit.

G L U T A T H I O N P E R O X Y D A S E

Nomenclature : E.C. 1.11.1.9.

Abréviation : GSH-Px

Réaction :



Déficit : Quelques observations

Clinique : Hémolyse médicamenteuse + méthémoglobine

Génétique : Transmission autosomique récessive (?)

La glutathion-peroxydase fait partie des systèmes d'oxydo-réduction intéressant le glutathion ; son action est couplée avec la glutathion réductase et les premières enzymes du shunt des pentoses. Les hématies disposent de deux systèmes enzymatiques de détoxication du peroxyde d'hydrogène ; l'un est commandé par la catalase, l'autre par la GSH-Px. COHEN et HOCHSTEIN (102) ont prouvé que c'était la GSH-Px qui réduisait physiologiquement H_2O_2 aux concentrations faibles ; la catalase ne semble agir qu'aux fortes concentrations.

L'enzyme a été purifiée par MILLS (261), puis par PAGLIA et VALENTINE (291). Ces auteurs ont défini les caractères physico-chimiques de l'enzyme et déterminé ses constantes de Michaelis vis-à-vis du glutathion et de l'eau oxygénée. Ils laissent présumer que l'activité enzymatique est dépendante des groupements sulfhydriles libres (74 - 139 - 140).

Etant l'enzyme fondamentale de la détoxication des peroxydes de l'hématie, il était prévisible que son déficit se traduirait par une hémolyse médicamenteuse comme c'est le cas pour les déficits en G-6PD, en glutathion-réductase et aussi en présence d'hémoglobines instables.

Les conséquences métaboliques seraient un taux de glutathion réduit normal, la formation accrue de dérivés d'oxydation de l'hémoglobine,

la présence de corps de Heinz, une anémie hémolytique.

Un tel aspect a été décrit par BRACCI et Coll. (75) en 1965 chez le nouveau-né, puis en 1968 par NECHELES et Coll. (270). Ces derniers ont rapporté 3 observations d'anémie hémolytique néo-natale dans lesquelles l'activité de la GSH-Px approchait 50 %. Il est important de noter que ces déficits furent tous transitoires et se normalisèrent en quelques semaines. L'hypothèse d'une immaturité physiologique aggravée de l'enzyme fut proposée.

Un déficit découvert chez un jeune adulte atteignant 70 % fut également rapporté par NECHELES et Coll. (271) en 1969. L'étude familiale semblait démontrer pour l'anomalie une transmission selon le mode autosomique récessif. Le patient était classé homozygote et ses collatéraux hétérozygotes avec une activité enzymatique égale à 60 % de la normale.

Deux autres cas de déficits chez l'adulte ont été décrits ; tous deux par BOIVIN et Coll. en 1969 (64) et 1970 (63). Dans chaque cas, il s'agit d'une hémolyse médicamenteuse avec méthémoglobinémie, les déficits atteignent environ 50 %. Mais les auteurs signalent n'avoir plus retrouvé le déficit enzymatique de leur premier malade revu dix-huit mois après l'accident hémolytique.

Cette constatation pose évidemment la question de la nature acquise des déficits en GSH-Px. Comme le font remarquer BOIVIN et Coll., le déficit n'est probablement pas exceptionnel, le peu de cas découverts tient vraisemblablement à une recherche non systématique.

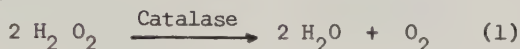
C A T A L A S E

Nomenclature : E.C. 1.11.1.6.

Peroxyde d'hydrogène oxydoréductase

Abréviation : néant

Réaction :



Déficit : Rare (environ 100 cas)

Clinique : Asymptomatique (sauf maladie de Takahara)

Génétique : Transmission autosomale récessive (?)

Enzyme très répandue, et facilement mesurée, la catalase a donné lieu à de très nombreux travaux (1).

Elle exerce son action catalytique selon deux modalités : si la concentration d' H_2O_2 est élevée, elle agit comme catalyseur décomposant (réaction 1), si elle est faible, elle exerce une action peroxydasique (réaction 2).

Son rôle protecteur de l'hémoglobine et d'autres protéines à groupements thiols, dans les conditions physiologiques, reste mal défini, mais cette enzyme est probablement présente en grand excès.

Plusieurs investigations ont démontré qu'il existe toute une série d'états pathologiques accompagnés d'une altération de l'activité catalasique du globule rouge (diminution chez les Noirs Américains sensibles à la Primaquine, variations quantitatives lors des hémoglobinopathies, etc...). Le résultat le plus intéressant est sans aucun doute la découverte de l'acatalasémie (ou acatalasie) (2 - 277 - 367).

Cette déficience enzymatique rare, on en connaît environ 100 cas, a été découverte par hasard au Japon (367) où se trouve localisée la majorité des cas. Quelques déficits ont également été mis en évidence en Suisse (2) et en Israël.

L'acatalasie ne s'accompagne d'aucun signe clinique, hormis les rares ulcérations des muqueuses décrites chez quelques patients par TAKAHARA (367).

N A D (P) H - D E S H Y D R O G E N A S E

Nomenclature : E.C. 1.6.99.

Synonymes : diaphorases - méthémoglobine - réductases

Réaction :

$$\text{NAD (P) H} + \text{Met Hb (Fe}^{+++}) \longrightarrow \text{NAD (P)} + \text{Hb (Fe}^{++})$$

Déficit : Environ 150 cas (NADH - diaphorase)

Clinique : Méthémoglobinémie

Génétique : Transmission autosomique récessive

Comme il a déjà été énoncé précédemment, les diaphorases sont au nombre de deux, dont les coenzymes sont le NADH et le NADPH (182 - 195 - 376).

-NADH-diaphorase

Cette enzyme couramment désignée diaphorase I a été mise en évidence en 1948 par GIBSON (149), il s'agit d'une flavoprotéine capable de transférer les électrons sur différents substrats dont la méthémoglobine (335 - 351).

Le déficit congénital en NADH-diaphorase est responsable de la méthémoglobinémie congénitale récessive (272 - 347 - 348) (la méthémoglobinémie à transmission dominante étant le fait d'hémoglobines anormales M). Elle se caractérise par une cyanose apparue dès la naissance et persistant toute la vie, son intensité varie en fonction du taux de méthémoglobine.

Cette maladie, assez bien supportée, ne se manifeste que chez les porteurs homozygotes de la tare ; le pourcentage d'activité diaphorasiqye résiduelle toujours très bas est variable ; il est de 50 % chez les hétérozygotes.

La plupart des cas sont de souche européenne, mais SCOTT (350) en a décrit plus de vingt cas en Alaska chez les Esquimaux.

L'étude électrophorétique de la NADH diaphorase (49 - 113 - 191 - 398), aisément réalisable, a permis à KAPLAN (195) de mettre en évidence une bande de mobilité anormale appelée "type Californie" chez un sujet déficient.

Ces variations qualitatives n'ont pu jusqu'à présent expliquer le mécanisme des troubles neurologiques associés à une vingtaine de cas de déficits en diaphorase I (137).

Chez le nouveau-né normal, le taux de NADH-diaphorase est nettement inférieur à celui de l'adulte. Cette immaturité enzymatique alliée à la présence d'hémoglobine foetale plus oxydable, explique en grande partie les cyanoses péri-natales passagères (193 - 323 - 324).

- NADPH - diaphorase

Ce système enzymatique, peu exploré jusqu'alors, apparaît comme un système non physiologique puisqu'il est incapable de fonctionner en l'absence d'un intermédiaire d'oxydo-réduction artificiel.

L'absence totale de symptôme clinique, et en particulier l'absence de méthémoglobinémie, chez un sujet déficient en NADPH-diaphorase, découvert en 1967 par SASS et Coll. (329), permettent d'affirmer le caractère non fonctionnel de l'enzyme en tant que méthémoglobine réductase.

Signalons que cette enzyme, également décelable par électrophorèse en gel d'amidon (195), présente une mobilité électrophorétique qui la distingue de la diaphorase I.

G A L A C T O K I N A S E

Nomenclature : E.C. 2.7.1.6.

ATP : D-galactose-1-phosphotransférase

Réaction :

Galactose + ATP $\xrightarrow{\text{Galactokinase}}$ Galactose-1-P + ADP

Déficit : 3 observations

Clinique : Galactosémie

Génétique : Transmission autosomique récessive (?)

Les voies du métabolisme qui permettent la conversion du galactose en glucose ont été éclaircies par LELOIR en 1951 (227). Le premier stade est une phosphorylation du galactose par l'ATP sous l'influence de la galactokinase.

Récemment, l'attention a été attirée sur cette enzyme par GITZELMANN. Ce dernier a eu le mérite d'individualiser en 1965 une forme de galactosémie héréditaire par absence d'activité de la galactokinase (151). Depuis, deux autres observations groupant trois autres cas dont un chez un nouveau-né, qui n'est pas sans analogie avec notre observation, ont été rapportées par le même auteur (152 - 155 - 375).

L'intérêt majeur des observations de GITZELMANN réside dans la démonstration que le galactose-1-phosphate n'est pas directement à l'origine des troubles du sujet galactosémique, puisqu'un syndrome analogue s'observe en l'absence de phosphorylation du glucose. Le rôle du galactitol, polyol provenant du galactose sous l'effet de l'aldolase réductase (118), semblant plus vraisemblable.

Les quelques travaux consacrés à l'étude de la galactokinase (9 - 170 - 355) ont permis de mettre en évidence l'enzyme dans le foie, le cerveau et d'autres tissus animaux. CUATRECASAS et SEGAL (110), étudiant

l'enzyme du foie de rat, ont suggéré qu'il en existait deux formes, foetale et adulte. Ultérieurement, MATHAI et BEUTLER travaillant sur des préparations partiellement purifiées ne trouvent pas de différence significative, hormis une constante de Michaelis légèrement différente pour le galactose, entre les galactokinases érythrocytaires foetale et adulte.

Il est formellement démontré que la galactokinase constitue d'abord une enzyme du jeune enfant, puisque son activité est 3 à 4 fois plus élevée dans le sang de cordon que chez l'adulte (254 - 275) (320 % de l'activité adulte selon nos résultats). Il a aussi été suggéré que la galactokinase constituerait l'étape régulatrice du métabolisme du galactose (110).

Ces différents résultats seront discutés ultérieurement.

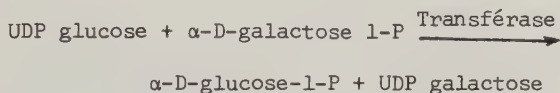
GALACTOSE-1-PHOSPHATE-URIDYLTRANSFERASE

Nomenclature : E.C. 2.7.7.12.

UDP Glucose : α -D-galactose-1-phosphate-uridyltransférase

Abréviation : Transférase

Réaction :



Déficit : Rare

Clinique : Galactosémie congénitale

Génétique : Transmission récessive autosomique

La galactose-1-phosphate uridyl-transférase ou transférase permet la transformation de l'UDP glucose en UDP galactose, tandis que le galactose-1-phosphate est libéré.

Le déficit du tissu hépatique en transférase provoque la galactosémie congénitale (165), mais KALCKAR, ANDERSON et ISSELBACHER (192) avant même que le déficit hépatique soit connu, avaient montré que les globules rouges des sujets galactosémiques présentaient une carence en transférase responsable de l'accumulation de galactose-1-phosphate dans la cellule. En dehors de toute considération d'ordre hématologique, c'est au titre de témoin d'un déficit que la transférase érythrocytaire nous intéresse.

L'enzyme n'a pas encore été préparée à l'état pur, mais ses caractères physico-chimiques sont assez bien connus (36 - 38). Les leucocytes sont riches en transférase. La stabilité médiocre de l'enzyme dans les cellules blanches, améliorée par l'apport de cystéine ou de β -mercaptoéthanol, permet de supposer la présence de groupements SH actifs dans la molécule (259).

L'étude des isoenzymes débute. En 1966, BEUTLER et Coll. (37) ont pu individualiser une forme génétiquement différente qu'ils ont nommée variante Duarte. L'enzyme a une mobilité supérieure à celle de l'enzyme normale, par contre le poids moléculaire, l'activité en fonction du pH, la thermostabilité et les constantes d'affinité pour les deux substrats paraissent identiques. (253 -274)

En France, SCHAPIRA et KAPLAN (332) ont décrit en 1969 une isoenzyme (variante Rennes) de mobilité inférieure à celle des témoins, chez deux jumeaux galactosémiques porteurs d'un déficit partiel en transférase.

La galactosémie est transmise comme une affection récessive autosomique. L'activité souvent trouvée augmentée chez les mongoliens a pu faire penser que le gène de structure de l'enzyme était porté par le chromosome 21 (331), mais cette hypothèse a été mise en défaut depuis, l'activité transférasique étant augmentée dans d'autres aberrations chromosomiques.

ADENOSINE TRIPHOSPHATASE

Nomenclature : E.C. 3.6.1.3.

Abréviation : ATPase

Réaction :



Déficit : 4 cas

Clinique : Anémie hémolytique (?)

Génétique : Caractère autosomique dominant (?)

L'ATPase ne fait pas partie des enzymes de la dégradation des oses, mais l'incidence hématologique de son déficit nous a paru justifier son introduction dans ce chapitre.

L'ATPase est une hydrolase qui hydrolyse l'ATP en ADP et orthophosphate avec libération d'énergie. Dans les hématies, l'ATPase est localisée dans la membrane (160) et on en distingue deux types : l'une inhibée par l'ouabaïne et stimulée par le sodium et le potassium, l'autre insensible à l'ouabaïne et stimulée par le magnésium. Le rôle de l'ATPase dans le globule rouge est avant tout un rôle de transport actif du sodium et du potassium de part et d'autre du stroma ; elle serait également nécessaire au maintien de la forme même du globule.

Malgré de nombreux travaux, les propriétés physico-chimiques de l'ATPase et sa localisation exacte restent très imprécises. On sait que le bon fonctionnement de l'ATPase dépend des ions sodium et potassium ; ce dernier peut être remplacé par d'autres cations monovalents (114 - 131 - 247 - 251 - 303).

Signalons entre autres les travaux de WALZ et CHAN (395) qui étudient le mécanisme de l'effet protecteur de la cystéine vis-à-vis du transport des ions et démontrent qu'il diffère de celui du potassium, tandis que

MATSUI et SCHWARTZ (255) ont tenté de déterminer le mécanisme d'inhibition de l'ATPase par certains glucosides cardiotoniques (ouabaine et digoxine). Ils estiment qu'il s'agit d'une inhibition allostérique induisant un effet stabilisateur vis-à-vis d'une forme intermédiaire de l'enzyme.

A notre connaissance, quatre déficits ont été rapportés jusqu'alors dont les trois premiers simultanément en 1964 par HARVALD et Coll. (168). Il s'agit de déficits partiels en ATPase sodium et potassium dépendante : le premier malade avait une anémie hémolytique transmise comme un caractère dominant (le taux d'ATPase chez son père était bas) ; le second malade souffrait d'un syndrome d'hypertension portale avec hémorragies digestives, et avait une soeur avec une ATPase abaissée, tandis que l'enzyme était normale chez ses parents ; le troisième malade avait présenté deux poussées de subictère et n'avait pas d'antécédents familiaux de type hémolytique.

Le quatrième cas décrit en 1968 par COTTE et Coll. (108) en France concerne un enfant de deux ans porteur d'une anémie hémolytique certaine avec ictère, splénomégalie et forte réticulocytose. Dans la recherche de la cause de l'hémolyse, le seul élément positif est l'abaissement à 50 % de la normale de l'ATPase magnésium dépendante. Le déficit enzymatique érythrocytaire n'atteint ni les plaquettes, ni les leucocytes, il n'a pas été retrouvé chez les parents ni chez les sept frères et soeurs du propositus...

A l'inverse, MIRCEVOVA et Coll. rapportent deux circonstances dans lesquelles l'activité de l'ATPase subirait une importante augmentation : dans la sphérocytose héréditaire (262), et dans l'hémoglobininurie paroxystique nocturne (73). Pour expliquer cela, les auteurs estiment que les conditions habituelles de traitement des stromas érythrocytaires en vue de l'extraction de l'ATPase permettent seulement la libération d'une fraction de l'enzyme ; partant de là ils forment l'hypothèse selon laquelle l'accroissement d'activité enzymatique dans la sphérocytose et l'hémoglobininurie paroxystique nocturne serait dû à une plus grande libération de l'enzyme, résultant elle-même d'une anomalie structurale de la membrane. Cette hypothèse-

se, pour séduisante qu'elle apparaisse, devra être confirmée par d'autres travaux.

N.B. : Il eût été nécessaire de compléter ce chapitre, consacré à un bref survol des enzymes du globule rouge, par l'étude d'autres activités enzymatiques intéressant l'érythrocyte : anhydrases carboniques, acétylcholinestérases, phosphoribosyltransférases, NADase, etc...

On voudra bien comprendre que le choix et la part consacrés aux enzymes décrites ont été dictés par les voies du métabolisme énergétique de l'hématie, les conséquences hématologiques des déficits connus, l'intérêt particulier ou nouveau de certaines molécules et aussi par le contenu de la suite de ce travail.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I - EXPLORATION DES ERYTHROENZYMOPATHIES

L'étude des enzymes s'est trouvée grandement facilitée par la mise à la disposition des biologistes de substrats et d'enzymes purifiés nécessaires aux techniques enzymologiques, mais le dépistage d'un déficit demeure délicat, tant par les questions qu'il pose que par les études qu'il suggère.

Avant de présenter les résultats de nos recherches, il nous semble indispensable de décrire rapidement les conditions opératoires choisies, et rigoureusement suivies, en indiquant les raisons de notre choix. En effet, le clinicien et le biologiste se trouvent désormais à la tête d'une abondante batterie de tests et de méthodes, parmi lesquels ils doivent d'un commun accord faire un choix selon le but des explorations qu'ils envisagent et selon les critères classiques de spécificité, sensibilité, reproductibilité, mais aussi de facilité et de coût ; toutes notions qui prennent en enzymologie une acuité particulière.

I. - RECHERCHE ET ETUDE D'UN DEFICIT.

- Du test de dépistage à l'automatisation...

On peut, sans trop s'avancer, affirmer que l'étude de la G-6PD domine chaque étape technologique de l'exploration des érythroenzymopathies.

Pour l'heure, il n'existe pas de test global, ou même un ensemble de tests simples, qui permettrait la mise en évidence rapide, sans même l'identifier, d'une erreur métabolique affectant une enzyme érythrocytaire. La multitude des paramètres et la traduction parfois fruste du déficit au

niveau de la cellule empêcheront vraisemblablement encore longtemps une telle réalisation. Les électrodes sélectives apporteront peut-être un début de solution lorsqu'elles seront applicables en microméthode.

Le seul test qui répond actuellement assez bien à ce désir permet le classement des anémies hémolytiques non sphérocytaires en deux types ; il s'agit de l'épreuve de correction de l'auto-hémolyse de SELWYN et DACIE (352) résumée au tableau 4 .

A l'exception de ce test, qui fut très précieux mais dont l'utilité s'estompe devant la vulgarisation et la relative facilité des mesures spectrophotométriques, les quelques épreuves indirectes décrites explorent les défaillances des mécanismes de génération du glutathion réduit et par là le déficit en G-6PD mais sans spécificité : recherche des corps de Heinz, diminution du taux de glutathion réduit, test de stabilité du glutathion réduit, épreuve de réversion de la méthémoglobine (85).

Les autres tests de dépistage, actuellement connus, sont au contraire doués de spécificité, mais pèchent par manque de sensibilité (hétérozygotes non dépistés, déficits masqués par les crises réticulocytaires). Ce sont les "spot-test" et "screening-test" des auteurs anglo-saxons (28 - 133 - 134 - 199).

De réalisation aisée, ces tests permettent de mener des études sur une grande échelle, à partir de sang total et sans matériel de mesure. Ce sont des tests colorés (réduction d'un sel de tétrazolium par exemple) ou de fluorescence (389 - 399) ; notons que leurs principes de révélation sont souvent utilisés avec profit pour la lecture des zymogrammes. Signalons encore le test de BRUNETTI, susceptible de dépister grossièrement un déficit en pyruvate kinase, et basé sur le changement de coloration d'un indicateur de pH par production de pyruvate (48).

Les techniques spectrophotométriques, méthodes de mesure, reposent sur le principe du test optique de WARBURG, et apprécient les variations de

Type	Fragilité osmotique		Autohémolyse 48 h, 37°C	
	Avant incubation	Après incubation 24 h - 37°C	Sans addition de glucose	Avec addition de glucose
"Type I"	Normale	Augmentée dans les limites normales	Normale ou légèrement augmentée	Diminuée
"Type II"	Normale	Très augmentée	Très augmentée (x20 normale)	Non diminuée

TABLEAU 4 : Classification des anémies hémolytiques congénitales non sphérocytaires selon SELWYN et DACIE (1954)

densité optique qui, en lumière ultraviolette, accompagnent le passage des formes oxydées aux formes réduites des pyridine nucléotides et vice versa (396).

Dans un tel système, où l'enzyme mesurée constitue le facteur limitant, il faut que le mélange réactionnel contienne une déshydrogénase à NAD ou à NADP. Cette obligation a parfois conduit à coupler deux ou trois systèmes enzymatiques dont l'un utilise le NAD ou le NADP (tableau 6).

L'intérêt des tests spectrophotométriques est très grand. Mises à part leurs qualités de spécificité, de sensibilité, ils rendent possible non seulement la mesure des activités enzymatiques mais aussi celle des intermédiaires de la glycolyse et des coenzymes. Leur usage désormais très étendu a provoqué la commercialisation de coffrets de réactifs prêts à l'emploi, correspondant aux déficits présumés les plus fréquents.

Le principe des réactions demeurant habituellement simple, il n'y a guère que le coût des réactifs et l'opportunité de telles méthodes qui ont pu retarder leur automatisation totale. Cette dernière réalisée pour certaines enzymes (178 - 318 - 368 - 378) répond essentiellement à deux buts : le dépistage, et plus souvent en raison de sa maniabilité l'étude des cinétiques par variation continue de certains paramètres (343), l'analyse automatique d'un effluent de colonne à chromatographie (319), etc...

- De la mise en évidence à l'étude de l'enzyme...

A moins que de réaliser un dépistage véritablement systématique, difficilement réalisable, seulement pratiqué actuellement dans quelques grandes agglomérations pour la galactosémie et le déficit en G-6PD, il est clair, et notre expérience nous l'a nettement confirmé depuis cinq ans, que la mise à jour d'une déficience d'une enzyme érythrocytaire découle presque toujours de l'aboutissement d'une hypothèse émise par le clinicien.

Bien sûr, au regard de la fréquence des déficits, cette hypothèse est souvent déçue. C'est là une raison supplémentaire qui nous fait croire qu'un bilan enzymatique érythrocytaire se doit de répondre à un acte réfléchi, plutôt qu'à une certaine "pêche à la ligne".

Le déficit mis à jour, la première réaction doit être de prudence, et la tâche primordiale est la confirmation de la déficience non seulement le jour-même (contrôle des techniques), mais aussi plusieurs semaines, voire plusieurs mois après.

Le déficit confirmé, une aventure passionnante (les deux mots conviennent) attend le biochimiste ; elle se présente sous forme de questions qui, jusqu'alors, restent souvent sans réponses pleinement satisfaisantes.

La première question est celle de la nature congénitale ou acquise de l'érythroenzymopathie. Actuellement, la plupart des déficits décrits dans les globules rouges sont congénitaux mais l'observation éparse de déficits appelés transitoires parce qu'ils n'ont pu être retrouvés chez le malade à l'occasion d'une nouvelle exploration, puis l'observation de déficits au cours de différentes circonstances pathologiques, sans qu'aucune transmission familiale puisse être démontrée, a ouvert le chapitre des érythroenzymopathies acquises.

Ces déficits d'abord considérés comme des artéfacts techniques (c'est vraisemblablement le cas pour un certain nombre d'entre eux) sont maintenant retrouvés trop régulièrement dans certaines circonstances, telles que les hémopathies (leucoses aiguës surtout), certaines hémolyses médicamenteuses, les états cirrhotiques pour être encore négligés. On peut même raisonnablement penser que les déficits acquis, quoique encore moins connus, sont beaucoup plus fréquents que les enzymopathies congénitales, mais leur caractère transitoire, lié à la présence de l'agent causal, rend leur exploration difficile.

Si la nature congénitale d'un déficit paraît probable, la recherche de porteurs homozygotes ou hétérozygotes de la tare chez les ascendants, descendants et collatéraux du malade, précisent généralement assez vite le type de la transmission héréditaire.

La deuxième question est celle de la recherche du mécanisme du déficit d'activité observé. Il faut éliminer la présence éventuelle d'un inhibiteur, mais seule l'étude des propriétés de l'activité enzymatique et de la molécule protéique qui en est le support, permet de préciser le type de la mutation génétique.

De telles recherches imposent, puisqu'il s'agit d'un déficit, la concentration et la purification partielle de l'enzyme, puis la comparaison des propriétés de la préparation obtenue à la préparation identique d'une enzyme normale : activité, constante de Michaelis vis-à-vis du substrat et éventuellement des coenzymes, activité en fonction du pH, mobilité électrophorétique, stabilité, etc...

Ces études rendues difficiles par la très faible quantité de protéine enzymatique susceptible d'être purifiée, et sa labilité, doivent permettre de dire si le défaut d'activité résulte de la production diminuée de l'enzyme normale ou de la présence d'une molécule qualitativement modifiée, ou encore s'il n'est que la traduction d'une exagération d'un mécanisme régulateur d'activation ou d'inhibition.

Une troisième question est celle de l'extension du déficit à des cellules ou tissus autres que le globule rouge. Les différences observées peuvent orienter vers l'hypothèse de formes moléculaires multiples différentes, transmises à partir de gènes et de loci eux-mêmes différents (56). A l'exception des leucocytes et des plaquettes, l'exploration de l'enzyme dans d'autres tissus chez un malade porteur d'une anémie hémolytique, comme c'est le cas général, pose tout de même quelques problèmes d'ordre moral, bien qu'elle soit souhaitable du seul point de vue scientifique !... Elle

n'est pratiquement jamais réalisée.

Une quatrième question, la plus ardue, est celle des retentissements métaboliques du déficit. Les relations biochimiques entre déficit et hyperhémolyse demeurent hypothétiques dans la majorité des cas ; ce n'est pas un mince problème que de constater qu'à déficit égal d'une même enzyme certains sujets sont asymptomatiques, alors que d'autres présentent une anémie hémolytique grave. De même, le retentissement, extrêmement variable, d'un blocage enzymatique selon le lieu où il se trouve localisé sur les voies du métabolisme glycolytique de l'hématie, reste mal expliqué.

Ces quelques généralités montrent la complexité de l'étude bien conduite d'une érythroenzymopathie - bien que le globule rouge soit un matériel de maniement aisé - et incitent à la prudence.

II. - BILAN ENZYMATIQUE ERYTHROCYTAIRE.

Nous négligeons volontairement d'exposer ici les raisons et les examens de laboratoire qui conduisent le clinicien à soupçonner une anémie hémolytique de cause globulaire et l'amène à demander la recherche d'une érythroenzymopathie éventuelle.

Ceci ne signifie pas pour autant que les renseignements cliniques (intensité de l'hémolyse, enquêtes familiales, origine géographique des ascendants) et les examens biologiques (en particulier la durée de vie des hématies) ne sont pas utiles au biochimiste. Bien au contraire, ils sont capables d'orienter ses recherches dans le sens d'une limitation et d'un approfondissement.

1. - Les éléments du bilan

- Recherche de l'agent causal d'une hémolyse.

Le bilan standard comporte la numération des hématies, l'appréciation de la réticulocytose, la mesure de dix-huit activités enzymatiques et la détermination de l'ATP et du glutathion (tableau 5).

- Recherche de l'agent causal d'une méthémoglobinémie.

La mesure de l'activité diaphorase est seulement entreprise lorsque le clinicien soupçonne la présence d'une méthémoglobinémie congénitale ; elle est alors accompagnée de la détermination de la méthémoglobine et de la recherche d'une hémoglobine anormale de type M.

- Recherche de l'agent causal d'une galactosémie.

En plus de la galactose-1-phosphate uridylyltransférase, et en raison des travaux de GITZELMANN (151), nous déterminons l'activité de la galactokinase, et aussi la consommation du galactose par les érythrocytes.

2. - Les méthodes.

- Le prélèvement.

Conditions

Prélevé chez le sujet à jeun et le matin - ceci en fonction du temps nécessaire à la réalisation du bilan - le sang (10 ml) est recueilli sur héparine sèche (10 à 20 U.I. pour 10 ml de sang), puis immédiatement placé dans la glace et transporté au laboratoire.

Le prélèvement d'un sang témoin, dans les mêmes conditions que celui présumé pathologique, est tout à fait souhaitable étant donné la labilité de certaines activités enzymatiques.

ERYTHROGRAMME

Hématies
Hématocrite
Réticulocytes

ENZYMESVOIE D'EMBDEN MEYERHOF

PHM	Phosphohexomutase
HK	Hexokinase
PHI	Phosphohexoisomérase
PFK	Phosphofructokinase
Aldo	Aldolase
PTI	Phosphotrioseisomérase
GAPD	Glycéraldéhyde-3-phosphate des.
DPGM	Diphosphoglyceromutase
PGK	Phosphoglycératekinase
PGM	Phosphoglycératemutase
Eno.	Enolase
PK	Pyruvate kinase
LDH	Lactico-déshydrogénase

VOIE DES PENTOSES PHOSPHATES

G6PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
6PGD	6-phosphogluconate déshydrogénase

SYSTEME D'OXYDO-REDUCTION

GR	Glutathion-réductase
	Catalase

Mg⁺⁺ ATPase

COENZYMES

ATP
Glutathion réduit

TABLEAU 5 : Bilan enzymatique érythrocytaire type

Pour permettre une interprétation correcte, le prélèvement devra toujours être effectué en dehors de toute période transfusionnelle, au moins deux mois après la dernière transfusion. Cette dernière condition, pourtant impérative, n'est malheureusement pas toujours réalisable chez les sujets atteints d'une anémie hémolytique grave et mal compensée.

Anticoagulant

A l'exception de la diaphorase pour laquelle il est préférable d'utiliser la solution de conservation A.C.D., le choix de l'héparine, utilisée par tous les auteurs, n'est théoriquement pas exempt de reproches (20 89). En effet, il a été démontré que cet anticoagulant exerce une action inhibitrice sur plusieurs activités enzymatiques ; cette action particulièrement nette sur la pyruvate kinase a même été mise à profit par HORN (180) pour doser l'héparine. En pratique, les hématies sont soumises à plusieurs lavages successifs qui éliminent totalement l'héparine et son pouvoir d'inhibition.

Appréciation des réticulocytes

Il est connu que les activités enzymatiques des réticulocytes sont beaucoup plus élevées que celles des hématies mûres ; l'appréciation des réticulocytes s'avère donc indispensable à l'interprétation des résultats, bien qu'elle ne résolve que très partiellement le problème de la répartition des hématies, donc des activités enzymatiques, selon l'âge.

La technique de coloration des réticulocytes ne suscite aucune difficulté : le véritable problème est celui de leur décompte exact, surtout quand ils sont peu nombreux. La méthode utilisée, coloration préalable puis décompte sur frottis, est valable pour les fortes réticulocytoses mais ne permet qu'une appréciation semi-quantitative. Nous estimons qu'il serait opportun d'utiliser dans les autres cas une méthode directe de numération des réticulocytes dans une cellule hématimétrique (298).

Le dénombrement des réticulocytes a pour seul but d'aider à l'in-

interprétation du bilan enzymatique en donnant une idée du nombre des éléments jeunes ; ces derniers étant plus résistants à la lyse hypotonique que les globules rouges âgés, la mesure de la résistance globulaire osmotique présente un intérêt complémentaire certain à condition qu'elle soit déterminée avec précision avec un appareil capable de tracer une courbe de répartition d'âge (386).

- La préparation de l'hémolysat :

Du prélèvement aux mesures enzymatiques, toutes les opérations sont conduites à + 4°C et le sang témoin traité exactement dans les mêmes conditions.

Les différentes étapes qui conduisent à l'hémolysat se schématisent ainsi :

- Après une première cantrifugation, élimination du plasma contenant les plaquettes et la couche leucocytaire. Notons, qu'à condition de partir d'un prélèvement un peu plus abondant (20 ml minimum), il est possible d'isoler également les plaquettes et les leucocytes dans le but de mesurer, par les mêmes techniques, les enzymes glycolytiques de ces éléments (88 - 91 - 300).

- Lavage du culot globulaire par le soluté physiologique à 3 reprises.

- Mesure du pourcentage d'hématies du culot globulaire lavé pour tenir compte du milieu de lavage inclus et permettre de rapporter les activités enzymatiques au volume de globules rouges.

- Hémolyse d'un volume connu du culot globulaire par congélations et décongélations successives ou par addition d'un agent hémolysant, généralement la digitonine. Les deux techniques d'hémolyse donnent des résultats absolument identiques ; nous utilisons de préférence la méthode à la digitonine pour sa plus grande rapidité.

- Elimination des stromas par centrifugation de l'hémolysat à grande vitesse.

- La mesure enzymatique.

a) Matériel

Sauf pour la diaphorase où on apprécie la disparition du 2,6-dichlorophénol-indophénol à 600 nm, et pour la catalase où on met à profit l'existence pour l'eau oxygénée d'un important pic d'absorption entre 230 et 240 nm, toutes les activités enzymatiques sont mesurées à 340 ou 366nm, longueurs d'onde auxquelles le NAD et le NADP sont utilisés comme de véritables indicateurs optiques. Toutes les mesures rapportées dans ce travail ont été réalisées en enregistrement continu au spectrophotomètre (Beckman DB) ou au photomètre avec passeur automatique d'échantillons (Eppendorf), les deux appareils étant thermostatés par le même courant d'eau à 25°C. Le respect de cette température se doit d'être très strict puisque l'unité internationale d'activité enzymatique a été primitivement définie à 25°C et que, selon les résultats expérimentaux (20), une élévation thermique de 1° entre 20 et 25°C accroît l'activité enzymatique de 7 %.

La forte absorption des hémolysats nous fait préférer les appareils munis d'un dispositif de surcharge électrique qui permet de se replacer dans la zone de plus grande sensibilité - et autorise la mise en oeuvre d'une plus grande quantité d'hémolysat.

Toutes les mesures volumétriques sont réalisées à l'aide de pipettes automatiques (Marburg).

b) Réactifs

Les substrats, coenzymes et enzymes ont pour origine les firmes Boehringer, Calbiochem, Sigma.

Les difficultés pratiques importantes, et peu contrôlables, nais-

sent de l'irrégularité de la qualité des réactifs ; les différences qui existent d'un lot de fabrication à un autre, même dans le sens d'une amélioration de la qualité, entraînent des variations brusques de normalité.

Il convient d'ajouter à cela les modifications intervenant au cours du stockage des réactifs et de la conservation des solutions.

Les solutions de substrats sont préparées soit en très petit volume et conservées à + 4°C durant quelques jours au maximum, soit en plus grandes quantités puis réparties en fractions et congelées à - 20°C. Les coenzymes préparés en quantités juste nécessaires, sont renouvelés chaque 24 ou 48 heures au maximum. Quant aux enzymes, elles se conservent correctement à + 4°C (88).

Durant toute la durée des mesures enzymatiques, tous les réactifs et les hémolysats, malade et témoin, sont maintenus à basse température par immersion dans une enceinte froide (bain de glace, accumulateur thermique).

Tous ces faits imposent d'inclure dans chaque série de dosages un témoin normal et représentent un obstacle à la comparaison des normalités obtenues d'un laboratoire à un autre.

c) Techniques (tableau 6)

Les activités enzymatiques, impérativement déterminées dans les quelques heures qui suivent le prélèvement, sont mesurées selon les techniques employées par CARTIER et Coll. (89) sauf pour la diphosphoglycéromutase (341), la catalase (244), la magnésium-ATPase (131), la glutathion réductase (244), la diaphorase NADH dépendante (244 - 347), la galactose-1-phosphate-uridyl-transférase (76) et la galactokinase.

Les principaux paramètres physico-chimiques susceptibles de modifier la vitesse d'une réaction enzymatique sont la nature et le pH du tampon, la température, la concentration en substrats et coenzymes.

ENZYME	Réf.	PRINCIPE DE LA MESURE
Phosphohexomutase	89	$G-1-P \xrightarrow{PHM} G-6-P$ $G-6-P + NADP \xrightarrow{\quad} 6-PG + NADPH$
Hexokinase	89	$\text{Glucose} + ATP \xrightarrow{HK} G-6-P + ADP$ $G-6-P + NADP \xrightarrow{G-6-PD} 6-PG + NADPH$
Phosphohexoisomérase	89	$F-6-P \xrightarrow{PHI} G-6-P$ $G-6-P + NADP \xrightarrow{\quad} 6-PG + NADPH$
Phosphofructokinase	89	$G-6-P + ATP \xrightarrow{PFK} F-1,6-DP + ADP$ $F-1,6-DP \xrightarrow{Aldo} GAP + DHAP$ $GAP \xrightarrow{PTI} DHAP$ $DHAP + NADH \xrightarrow{GAPD} 2-Glycéro-P + NAD$
Aldolase	89	$F-1,6-DP \xrightarrow{Aldo} GAP + DHAP$ $GAP \xrightarrow{PTI} DHAP$ $DHAP + NADH \xrightarrow{GAPD} 2-Glycéro-P + NAD$
Phosphotrioseisomérase	89	$GAP \xrightarrow{PTI} DHAP$ $DHAP + NADH \xrightarrow{GAPD} Glycéro-P + NAD$
Glycéraldéhyde-3-P-déshydrogénase	89	$GAP + NAD \xrightarrow{GAPD} 3-PG + NADH$
Diphosphoglycéromutase	341	$F-1,6-DP \xrightarrow{Aldo} GAP + DHAP$ $DHAP \xrightarrow{PTI} GAP$ $GAP + PO_4 + NAD \xrightarrow{GAPD} 1,3-DPG + NADH$ $1,3-DPG \xrightarrow{DPGM} 2,3-DPG$
Phosphoglycératekinase	89	$3-PG + ATP \xrightarrow{PGK} 1,3-DPG + ADP$ $1,3-DPG + NADH \xrightarrow{GAPD} GAP + NAD$
Phosphoglycératemutase	89	$3-PG \xrightarrow{PGM} 2-PG \xrightarrow{Eno} PEP$ $PEP + ADP \xrightarrow{PK} \text{Pyruvate} + ATP$ $\text{Pyruvate} + NADH \xrightarrow{LD} \text{Lactate} + NAD$
Enolase	89	$2-PG \xrightarrow{Eno} PEP$ $PEP + ADP \xrightarrow{PK} \text{Pyruvate} + ATP$ $\text{Pyruvate} + NADH \xrightarrow{LD} \text{Lactate} + NAD$
Pyruvatekinase	89	$PEP + ADP \xrightarrow{PK} \text{Pyruvate} + ATP$ $\text{Pyruvate} + NADH \xrightarrow{LD} \text{Lactate} + NAD$
Lactico-déshydrogénase	89	$\text{Pyruvate} + NADH \xrightarrow{LD} \text{Lactate} + NAD$
Glucose-6-P-déshydrogénase	89	$G-6-P + NADP \xrightarrow{G6PD} 6-PG + NADPH$
6-phospho-gluconate déshydrogénase	89	$6-PG + NADP \xrightarrow{6-PGD} \text{Ribulose-5-P} + CO_2 + NADPH$
Glutathion-réductase	244	$G.S.S.G. + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP$
Catalase	244	$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O + O_2$
Mg ⁺⁺ ATPase	131	$ATP + H_2O \xrightarrow{ATPase} ADP + H_3PO_4$ $ADP + PEP \xrightarrow{PK} \text{pyruvate} + ATP$ $\text{Pyruvate} + NADH \xrightarrow{\quad} \text{Lactate} + NAD$

TABLEAU 6 : Principe de mesure des activités enzymatiques

La mise en oeuvre de systèmes de réactions souvent complexes, comprenant une ou deux réactions intermédiaires, pose des problèmes théoriques: les enzymes des réactions secondaires ne se trouvent pas nécessairement dans leurs conditions optimales de pH et les produits de ces réactions en s'accumulant peuvent provoquer l'inhibition ou l'activation du système mesuré.

Selon CARTIER (87), dans les conditions où elles sont déterminées *in vitro*, à des concentrations saturantes en substrat et en coenzymes, les activités enzymatiques expriment des vitesses limites maxima jamais atteintes dans les conditions intracellulaires.

En pratique où il s'avère difficile de mesurer, en quelques heures, chaque enzyme, d'un bilan en comprenant une vingtaine, dans ses conditions optimales, il est apparu nécessaire aux différents auteurs de tenter une standardisation des conditions opératoires et des réactifs.

Ainsi plutôt que d'ajuster exactement le pH du milieu réactionnel au pH optimal de l'enzyme mesurée, la règle est de se maintenir à proximité du pH physiologique d'ailleurs jamais très éloigné du pH optimal sauf pour la phosphoglycérate mutase dont l'activité optima se situe à pH 6,5 ; toutes les autres enzymes de la voie glycolytique d'Embden-Meyerhof et du shunt des pentoses phosphates ont leur activité maximale de pH 7,3 à 8,4 et les variations, à mesure que l'on s'éloigne du pH optimum, sont très dissemblables d'une enzyme à l'autre.

Il faut souligner le mérite particulier de CARTIER et Coll. (89) pour l'effort de standardisation des techniques qu'ils ont accompli. Ces auteurs ont recommandé l'usage d'une unique solution tampon triéthanolamine-éthylène-diamine-tétra-acétique de pH 7,6, réduit à 30 le nombre des réactifs nécessaires à la mesure de 14 activités enzymatiques du globule rouge et calculé les volumes de façon à permettre l'usage exclusif des pipettes automatiques.

L'instabilité de certaines molécules enzymatiques, généralement

beaucoup plus importantes dans les hémolysats que dans les hématies intactes est une autre difficulté qui est partiellement levée en appliquant des conditions opératoires strictes et reproductibles dans le temps (préparation de l'hémolysat juste avant le début des mesures, ordre des mesures, comparaison avec le témoin).

d) Expression des résultats.

La vitesse maximale d'une réaction enzymatique mesure, dans des conditions expérimentales définies, la quantité de protéine enzymatique présente dans le milieu de réaction. Le résultat de la mesure doit exprimer cette vitesse maximale en un système d'unités standard et la rapporter à un paramètre tissulaire convenablement choisi.

Les activités enzymatiques sont encore assez souvent exprimées par différents systèmes d'unité, mais l'unité internationale, applicable à toutes les enzymes, indépendante du volume du milieu réactionnel et de la longueur d'onde de lecture, apparaît comme la plus logique.

Une unité internationale (U.I.) correspond à une micro-mole de substrat transformée par minute à 25°C. Les activités enzymatiques du globe rouge peuvent être rapportées à 1 ml de globules rouges, à 1 g. de globules rouges, à un nombre déterminé de cellules (généralement 10^9 ou 10^{11}), ou à la concentration en hémoglobine.

Dans les deux premiers cas, on doit tenir compte du plasma inclus et pratiquer un hématocrite sur le culot globulaire lavé pour effectuer la correction. Si on rapporte le résultat au nombre de globules rouges, il faut effectuer une numération avant hémolyse et dans le dernier cas l'hémoglobine doit être dosée sur l'hémolysat.

Les facteurs de conversion de ces diverses expressions chez l'homme normal ont été présentées sous forme d'un tableau à double entrée par CARTIER et Coll. (89).

Parmi ces différents éléments de référence possibles, le volume comme le poids de globules rouges nous semble représenter le plus fidèlement la quantité réelle de matière globulaire. Ceci pour plusieurs raisons techniques et théoriques :

- L'hématocrite, pratiqué en double, est par rapport à la mesure de l'hémoglobine et surtout de la numération, l'examen de loin le moins entaché d'erreur.

- Il est de réalisation à la fois simple et rapide. Ce dernier argument a toutefois perdu de l'importance avec l'usage des appareils automatiques.

- Il tient compte des variations de taille et de volume des globules rouges contrairement à la numération ; ceci nous semble un argument fondamental dans l'exploration de malades atteints d'anémie et, par conséquent, souvent d'anisocytose.

Nous exprimons habituellement les activités enzymatiques en Unités Internationales par ml de globules rouges par minute à 25 °C et à pH 7,6.

Une incertitude dans l'expression des résultats concerne la G-6PD et les activités enzymatiques où la G-6PD est ajoutée au cours du dosage comme enzyme accessoire. En effet le 6-phospho-gluconate formé est oxydé par la 6-phospho-gluconate deshydrogénase de l'hémolysat et une seconde molécule de NADP est réduite. Le calcul des activités dans ce cas précis devrait donc faire intervenir la réduction de deux molécules de NADP.

CARTIER et Coll. (89) obtiennent expérimentalement des valeurs proches de 1,5 alors que le coefficient serait théoriquement de 2 ; ces auteurs, comme nous-mêmes, ne tiennent pas compte arbitrairement de ce facteur de correction.

Il est à noter que la stimulation de la double réduction du NADP

est exploitée pour intensifier la révélation des activités enzymatiques des électrophorégrammes, en particulier lorsqu'on utilise la fluorescence du NADPH (389).

3. - L'interprétation (Tableau 7)

Nous l'avons déjà dit, elle doit être prudente.

En effet, en plus des difficultés habituelles propres à l'enzymologie, l'exploration des enzymes érythrocytaires se heurte à des problèmes particuliers.

Parmi ceux-ci, la possibilité de contamination des suspensions érythrocytaires par les leucocytes et les plaquettes qui diffèrent du globe rouge par la répartition des activités des enzymes glycolytiques se trouve presque totalement éliminée si les centrifugations sont bien conduites.

L'écueil le plus important et le moins contrôlable actuellement par des moyens simples réside dans l'hétérogénéité de la population d'hématies explorée.

L'interprétation des résultats sera réalisée en se rapportant aux valeurs normales du laboratoire, en tenant compte du nombre des réticulocytes, et en comparant toute activité perturbée à la même activité mesurée sur le témoin normal du jour.

Les différents auteurs s'accordent généralement pour soupçonner un déficit lorsque la baisse d'activité par rapport aux valeurs normales approche 50 %. La conclusion n'étant tirée qu'après confirmation du déficit à partir d'un autre prélèvement. Notons encore que l'interprétation d'une importante augmentation d'activité reste actuellement sans issue en dehors des cas où elle est motivée par une forte réticulocytose.

E N Z Y M E S		BOIVIN (54)	CARTIER (89)	LOHR (108)	NOS RESULTATS
VOIE d'EMBDEN MEYERHOF					
PHM	Phosphohexomutase	0,09 + 0,02	0,29 + 0,07	6,6 + 0,9	0,27 + 0,11
HK	Hexokinase	7,28 + 1,23	0,14 + 0,03	0,18 + 0,03	0,18 + 0,07
PHI	Phosphohexoisomérise	0,34 + 0,06	6,96 + 1,10	9,8 + 0,08	7,7 + 0,9
PFK	Phosphofructokinase	0,23 + 0,06	0,80 + 0,20	1,9 + 0,24	2,85 + 0,85
	Aldolase	319 + 70	0,37 + 0,06	0,55 + 0,05	0,58 + 0,12
PTI	Phosphotrioseisomérase	25,4 + 4,75	257 + 44	45,8	650 + 100
GAPD	Glyceraldéhyde-3-phosphate des.	0,30 + 0,05	11,4 + 1,9		12,1 + 2,5
DPGM	Diphosphoglycéromutase	33 + 4,85	0,30 + 0,05		0,29 + 0,05
PGK	Phosphoglycératokinase	5,80 + 1,6	26,7 + 4,9	57 + 0,6	31,1 + 5,1
PGM	Phosphoglycératemutase	0,52 + 0,14	4,66 + 0,9	8,3 + 0,6	6,2 + 1,6
Enlase		1,21 + 0,20	1,45 + 0,3	4,1 + 1,1	4,5 + 0,8
PK	Pyruvate kinase		2,43 + 0,45	4,6 + 0,7	2,53 + 1,00
LDH	Lactico-déshydrogénase		16,8 + 3,0	30 + 4	30 + 8
VOIE DES PENTOSE PHOSPHATES					
G6PD	Glucose-6-phosphate déshydrog.	1,39 + 0,18	1,27 + 0,20	1,90 + 0,20	1,96 + 0,48
6PGD	6-Phosphogluconate déshydrog.	0,81 + 0,19	0,54 + 0,10	0,85 + 0,10	1,31 + 0,23
SYSTEME D'OXYDO-REDUCTION					
GR	Glutathion réductase	0,78 + 0,16		1,08 + 0,14	1,05 + 0,25
	Catalase				600 + 128
	Magnésium-ATPase	4,14 + 0,42		3,6 + 0,4	3,8 + 0,3

TABLEAU 7 : Valeurs normales des activités enzymatiques (Unités internationales/ml GR/mn, à 25°C)

Nos valeurs normales et leurs écarts, déterminées par chaque enzyme sur au moins 50 sujets adultes sains, hommes et femmes, d'âge compris entre 18 et 60 ans (donneurs de sang) figurent, ainsi que celles d'autres auteurs, au tableau 7.

CHAPITRE II - NOUVELLES METHODES D'ETUDE DE LA GALACTOKINASE.

Les travaux consacrés au métabolisme du galactose dans l'hématie demeurèrent pour la plupart limités à la galactose-1-phosphate uridyl-transférase jusqu'à la découverte en 1965 du premier déficit en galactokinase par GITZELMANN (151).

Ces faits expliquent sans aucun doute le peu d'intérêt suscité jusqu'alors par la galactokinase érythrocytaire et par contre-coup la rareté des méthodes de mesure proposées ainsi que leur adaptation médiocre aux besoins cliniques.

I. - MESURE DE LA GALACTOKINASE PAR UNE METHODE DIRECTE.

1. - Rappel et étude critique des méthodes existantes.

La mesure de la galactokinase érythrocytaire est rendue difficile par sa faible activité et aussi parce que la réaction n'est pas directement couplée à la réduction ou à l'oxydation d'un coenzyme pyridinique.

A notre connaissance deux types de méthodes ont été proposées, l'un par MAXWELL, KURAHASHI et KALCKAR (256) en 1962, l'autre par ROBINSON (316) et SHERMAN (354 - 355) en 1963.

Il s'agit dans les deux cas de méthodes indirectes appliquées aux extraits bactériens qui comprennent dans un premier temps une incubation pendant laquelle se forme du galactose-1-phosphate, puis dans un deuxième temps l'appréciation du galactose-1-phosphate formé.

Le premier temps est commun aux deux méthodes qui diffèrent essentiellement dans leur principe par les moyens de mesure du galactose-1-phosphate : MAXWELL et Coll. utilisent la voie enzymatique et mesurent au spectrophotomètre la production de NADPH, tandis que ROBINSON et SHERMAN qui emploient le galactose marqué au carbone 14 séparent par chromatographie sur papier DEAE-cellulose le galactose et le galactose-1-phosphate, puis pratiquent après élution un comptage isotopique en milieu liquide.

Les quelques auteurs qui, depuis 1963, ont fait état dans leurs travaux de mesures de l'activité galactokinase utilisent tous le principe décrit par SHERMAN en lui apportant quelques modifications mineures, l'appliquant à la galactokinase du foie (110) ou des érythrocytes (154 - 257 - 275).

Les variations apportées résumées dans le tableau 8 portent sur la concentration des substrats, le pH de la réaction, le temps et la température de développement de la réaction enzymatique, la défécation, le volume

	MAXWELL et coll. (256)	ROBINSON (316)	SHERMAN (354)	CUATRECASAS, SEGAL (110)	Ng et coll. (275)	MATHAI, BEUTLER (254)	MAYES, GUTHRIE (257)
ANNEE	1962	1963	1963	1965	1965	1967	1968
TAMPON	TRIS	TRIS EDTA	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS	TRIS
pH	7,5	7,5	7,8	7,1	7	7,4	7,8
Composés SH	-	-	Mercapto éthanol	Mercapto éthanol	-	Mercapto éthanol	-
Réaction ((temps(mn)	10 à 30	2	25	6	30	60 à 180	30
((t°	37	37	35	37	37	37	37
enzymatique((arrêt (	BMB	BMB	-	-	BMB	addition galactose	BMB
Mesure du Gal-1-P	Méthode enzymati- que	Comptage isotopique					

TABLEAU 8 : Méthodes de mesure de l'activité galactokinase

réactionnel.

La méthode au galactose marqué possède certainement sur la détermination purement enzymatique un avantage incontestable de précision. Elle comporte par contre des inconvénients :

- Nécessité de galactose marqué au carbone ^{14} et d'un compteur à scintillations en milieu liquide.
- Méthode longue et de réalisation complexe.
- Obligation d'effectuer le dosage en double et d'établir un témoin réactif, ce qui multiplie les chromatographies et les comptages isotopiques.
- La spécificité dépend de la qualité de la séparation chromatographique.
- Impossibilité de suivre le déroulement de la réaction.

A ces objections purement techniques, deux points inhérent au principe nous paraissent critiquables : l'activité de la galactokinase est supposée constante dans le temps et le galactose-1-phosphate considéré comme le terme ultime de la réaction.

Selon les auteurs, le temps d'incubation proposé varie de 10 à 60, et même 180 mn alors que rien ne prouve à priori que l'activité enzymatique évolue selon une réaction d'ordre zéro devant toute l'incubation. D'ailleurs CUATRECASAS et SEGAL (110), étudiant la galactokinase hépatique du rat, ont démontré que dans leurs conditions opératoires la production de galactose-1-phosphate n'est proportionnelle au temps d'incubation que durant les dix premières minutes ; ils observent ensuite une diminution de la vitesse de la réaction. De leur côté, MATHAI et BEUTLER (254) ont mis en évidence l'inhibition de l'activité galactokinase par le galactose-1-phosphate.

Appliquée à la mesure de l'enzyme érythrocytaire, rien ne semble s'opposer à ce que le galactose-1-phosphate formé ne soit à son tour dégradé car l'hémolysat contient obligatoirement en petites quantités les substrats et les enzymes nécessaires à la poursuite de la réaction. Cette hypothèse se trouve confirmée par les travaux de NG (275) qui détecte la formation d'uridine-diphosphogalactose marqué (10 % du galactose-1-phosphate). En fait cette objection est réduite à néant grâce à un heureux concours de circonstances : d'une part il ne se produit pas d'uridine-diphosphoglucose car l'épimérase se trouve inactivée dans les conditions de la réaction, d'autre part l'uridine-diphospho-galactose migre comme le galactose-1-phosphate, par chromatographie sur papier DEAE-cellulose.

Un point de technique reste à discuter : il a été montré que le seul fait de déposer le mélange d'incubation sur le papier à chromatographie ne pouvait stopper la réaction enzymatique comme l'écrit SHERMAN (354). Il convient, pour éviter cet inconvénient, de provoquer une inactivation soit par défécation par l'eau à ébullition ou l'alcool, soit par le froid, ou encore par inhibition par le galactose (254) ; l'usage des défécants habituels étant incompatible avec les mesures isotopiques (273).

2. - Méthode proposée

Plusieurs raisons nous ont conduit à rechercher, à partir des méthodes existantes, une technique plus simple capable de mesurer l'activité de la galactokinase érythrocytaire.

Elles se résument ainsi :

- Posséder une méthode de réalisation rapide compatible avec les besoins cliniques.
- Travailler en microméthode, le nouveau-né constituant l'indication majeure de la mesure enzymatique.
- Intégrer cette mesure dans notre bilan enzymatique c'est-à-dire me-

surer cette activité avec le matériel et les réactifs déjà employés dans un but de standardisation.

- Nous ne disposions pas de moyens d'investigation isotopique.

Seul un test optique direct, couplé à l'oxydation ou à la réduction d'un coenzyme pyridinique nous a semblé pouvoir répondre à nos exigences. Dans le but de justifier notre choix, il est nécessaire de préciser pourquoi la réalisation de ce test considéré comme le plus satisfaisant du point de vue théorique (331) n'avait pas été envisagée : on pensait généralement qu'il manquerait de sensibilité pour mesurer correctement la faible activité de la galactokinase érythrocytaire ($0,219 \pm 0,042$ U.I./ml GR). Cet argument n'est plus satisfaisant et se trouve contredit en plusieurs points :

- La forte absorption des hémolysats, entraînant la limitation stricte du volume de la prise d'essai, constituait un écueil majeur à l'augmentation de la sensibilité. Cet inconvénient est désormais levé par l'emploi d'un photomètre à dispositif de surcharge électrique qui permet de se placer dans la zone de plus grande sensibilité.

- D'autres enzymes érythrocytaires, la phosphohexomutase ($0,27 \pm 0,11$ U.I./ml GR), et à fortiori l'hexokinase ($0,18 \pm 0,7$ U.I./ml GR), d'activité de même ordre ou inférieure à celle de la galactokinase se satisfont très bien des mesures spectrophotométriques directes.

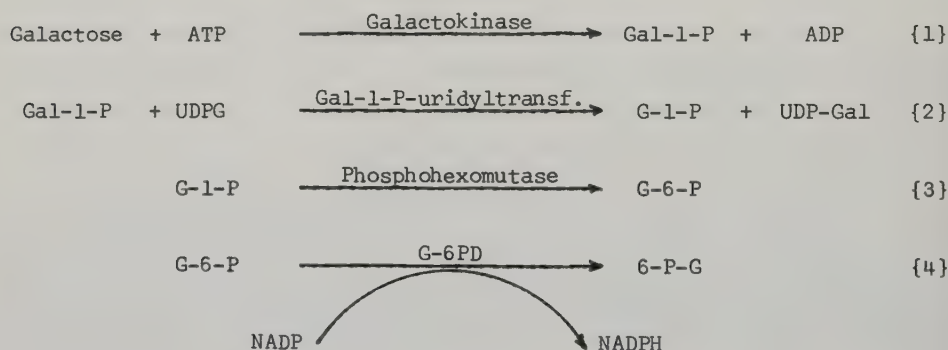
- D'un point de vue purement pratique, le dépistage de la galactosémie pour être efficace doit se pratiquer chez le nouveau-né soit à une période de la vie où l'activité de la galactokinase érythrocytaire se trouve augmentée deux à trois fois par rapport aux valeurs normales adultes ; elle est donc encore plus facilement mesurable.

- La succession des réactions enzymatiques conduisant à la mesure de l'activité galactose-1-phosphate uridylyl-transférase par mesure photométrique directe est identique, sauf qu'elle comporte trois réactions successi-

ves au lieu de quatre pour la galactokinase. Or deux méthodes reposant sur ce principe ont été proposées pour la galactose-1-phosphate uridylyltransférase, dont l'activité est du même ordre de grandeur que celle de la galactokinase, par BEUTLER et MITCHEL en 1968 (40), puis COPENHAVER et Coll. (105) en 1969. Ces auteurs mettent à profit les propriétés de fluorescence du NADPH formé.

a) Principe.

Inspiré de la technique de MAXWELL et Coll. (256) pour la mesure d'activité de la galactokinase des bactéries, et de celle de BEUTLER et MITCHEL (40) pour la mesure directe de la galactose-1-phosphate-uridylyltransférase des hématies, le principe proposé pour la détermination spectrophotométrique directe à 366 nm (ou 340 nm) se schématise ainsi :



Le galactose-1-phosphate formé par la galactokinase est transformé en glucose-1-phosphate sous l'action de la galactose-1-phosphate-uridylyltransférase. Le glucose-1-phosphate est converti en glucose-6-phosphate par la phosphohexomutase. Enfin, le glucose-6-phosphate formé est oxydé en 6-phosphogluconate, en présence de NADP et de glucose-6-phosphate déshydrogénase. Chaque oxydation se traduit par la réduction d'une molécule de NADP en NADPH. Le NADPH formé en quantité proportionnelle au galactose phosphorylé est dé-

terminé au spectrophotomètre par mesure de l'accroissement de la densité optique.

b) Réalisation

Extrêmement simple et rapide, la détermination de l'activité galactokinase se pratique sur 100 μ l d'hémolysat dilué au dixième ; la mesure photométrique, enregistrée de façon continue, demande environ 15 minutes.

Réactifs

A l'exception de la solution de galactose, les réactifs sont identiques aux préparations utilisées pour la mesure d'autres activités enzymatiques de notre bilan.

- Tampon TEA/EDTA pH 7,6

TEA base (Merck)	14,92 g
EDTA, 2 H ₂ O (Merck)	3,72 g
Eau distillée	Q.S.P. 1000 ml
Ajuster à pH 7,6 avec H Cl N	
Conservation à + 4°C.	

- Chlorure de magnésium à 600 mM/l

Mg Cl ₂ , 6 H ₂ O (Merck)	1,22 g
Eau distillée	Q.S.P. 10 ml
Conservation à + 4°C.	

- NADP à 15 mM/l

NADP sel de sodium (Boehringer)	11,5 mg
Na H CO ₃ à 1 % (p/v)	1 ml
Conservation à + 4°C limitée à 24 ou 48 H.	

- Glucose-6-phosphate déshydrogénase à 2 mg/ml.

G-6PD Boehringer (réf 15.303)

Conservation à + 4°C.

- Adénosine-triphosphate à 52,5 mM/°

ATP, sel de sodium, 3 H₂ O (Boehringer) 31,77 mg

Na H CO₃ à 5 % (p/v) 1 ml

Conservation par congélation à - 20°C ou quelques jours à + 4°C.

- Galactose à 600 mM/°

Galactose pur (R.A.L.) 1,081 g

Eau distillée Q.S.P. 10 ml

Conservation par congélation à -20°C ou à + 4°C.

Mesure

La concentration des réactifs permet l'usage des pipettes automatiques Marburg pour la mesure de tous les volumes à l'exception de la solution tampon.

Introduire successivement dans une cuve de trajet optique de 1 cm

Tampon TEA/EDTA, pH 7,6..... 2050 µl

Mg Cl₂ (600 mM/°) 50 µl

NADP (15 mM/°) 100 µl

G-6PD (2 mg/ml) 5 µl

ATP (52,5 mM/°) 200 µl

Hémolysat au 1/10ème 100 µl

Galactose (600 mM/°) 500 µl

Il est nécessaire d'attendre la stabilisation de la densité optique du milieu réactionnel avant d'ajouter le galactose dans le but d'épuiser le galactose-1-phosphate, le glucose-1-phosphate et le glucose-6-phos-

phate qui seraient éventuellement présents dans l'hémolysat. La réaction se trouve ainsi obligatoirement limitée par l'activité de la galactokinase.

Notons toutefois que le dosage des intermédiaires de la glycolyse montre que ces trois composés sont présents en quantité très faible, ou sont absents, même lorsque le sang est recueilli dans l'acide perchlorique réfrigéré pour éviter toute dégradation (88).

Enregistrer la variation de densité optique à 340 nm ou 366 nm à 25°C en vitesse lente.

Expression des résultats.

A partir de l'enregistrement obtenu pendant les quinze premières minutes, calculer la variation de densité optique par minute ($\Delta E/\text{minute}$).

Le coefficient d'extinction molaire du NADPH est de :

$6,22 \times 10^6 \text{ cm /Mole à } 340 \text{ nm}$
 $3,30 \times 10^6 \text{ cm /Mole à } 366 \text{ nm.}$

L'activité enzymatique par ml de globules rouges est :

$$\Delta E/\text{minute} \times \frac{3}{\text{Coefficient d'extinction du NADPH}} \times \frac{1.000}{\mu\text{l prise d'essai}} \times \frac{100}{\% \text{ d'hématies du culot globulaire}} \times 10$$

c) Discussion

α - Validité

Du fait de la mise en oeuvre successive de quatre systèmes réactionnels, la validité de la méthode peut être discutée. Elle est démontrée par les essais suivants :

- aucune formation de NADPH en l'absence de galactose,
- aucune formation de NADPH en l'absence d'ATP,
- aucune formation de NADPH en l'absence d'ions magnésium (chlorure de magnésium) alors que les autres enzymes en cause (galactose-1-phosphate uridylyltransférase, phosphohexomutase, glucose-6-phosphate déshydrogénase) ne nécessitent pas la présence de cet ion pour leur activité,
- l'épimérase ou galacto-waldénase, susceptible de transformer l'uridine-diphosphoglucose en uridine diphosphogalactose, et inversement, est inactive dans les conditions de la réaction (110),
- comme pour les autres déterminations enzymatiques utilisant la G-6PD il est possible que le 6-phosphogluconate formé dans la réaction {4} soit à son tour transformé, sous l'action de la 6-phosphogluconate déshydrogénase apportée par l'hémolysat, avec production de NADPH.

Il s'agit là d'un phénomène peu contrôlable et qui devrait, s'il était fonctionnel, conduire à des résultats supérieurs à ceux des autres auteurs. Or ce n'est pas le cas. Comme nous l'avons dit précédemment, l'habitude est de ne pas tenir compte d'une correction éventuelle.

- les mesures d'activité par spectrophotométrie directe concordent avec les résultats de la méthode isotopique selon NG (275) réalisée parallèlement grâce à l'obligeance du Service des Isotopes du C.H.U. (Professeur BURG).

β - Conditions

. Concentration des substrats :

La validité des concentrations choisies pour le galactose et l'ATP est démontrée par la proportionnalité des activités enzymatiques mesurées à partir de volumes différents d'un même hémolysat.

En ce qui concerne l'uridine diphosphoglucose, il est remarquable de constater que les essais effectués avec ou sans addition d'uridine di-

phosphoglucose conduisent à des résultats strictement identiques démontrant ainsi que l'hémolysat apporte ce composé en quantité suffisante étant donné l'activité faible de la galactokinase.

. Enzymes :

Comme pour l'uridine diphosphoglucose, l'addition de galactose-1-phosphate uridylyltransférase et de phosphohexomutase autres que celles contenues dans l'hémolysat n'est pas indispensable à la bonne marche de la réaction (37 - 105).

Par contre, il est indispensable d'ajouter de la G-6PD en excès ; dans le cas contraire la cinétique de la réaction s'aplatie après une dizaine de minutes.

. pH :

Selon les travaux de MAYES et GUTHRIE (257), l'activité optima de l'enzyme est observée entre pH 7,8 et 8,2 - et une diminution nette d'activité apparaît assez rapidement à mesure que l'on s'écarte de ces valeurs.

Nos essais confirment le plateau de maximum d'activité de MAYES et GUTHRIE, mais l'allure générale de la courbe d'activité en fonction du pH que nous obtenons diffère notablement de celle de ces auteurs. L'activité enzymatique nous apparaît beaucoup moins sensible aux variations de pH.

d) Résultats

α - Valeurs normales (Figures 4 et 5).

. Adultes

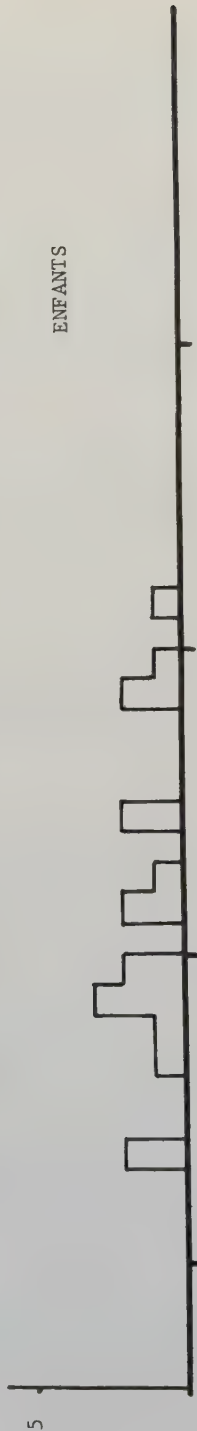
Les valeurs normales de l'activité enzymatique, déterminées à partir de 50 sujets adultes sains (donneurs de sang), s'étalent de 0,177 à 0,261 U.I./ml GR ($m \pm 2 \sigma$: $0,219 \pm 0,042$ U.I./ml GR).

Ces valeurs s'accordent bien avec les taux d'activité rapportés

SANG DU CORDON



ENFANTS



ADULTES

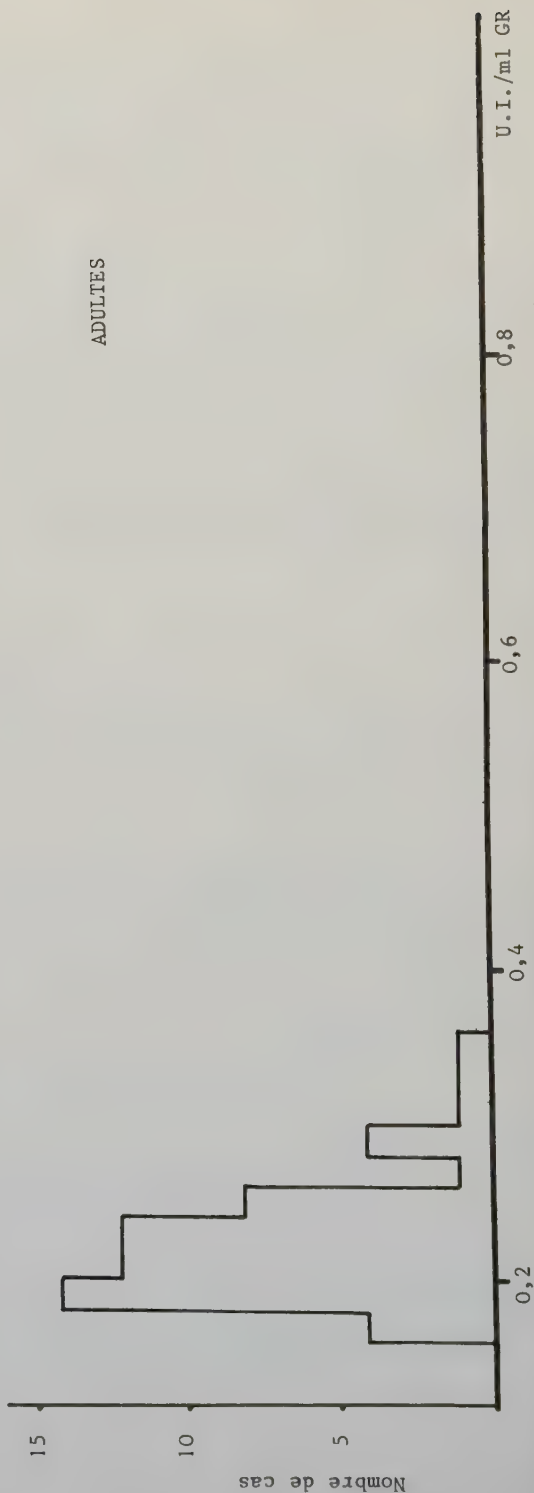


FIGURE 4 : Répartition de l'activité de la galactokinase

	ADULTES	ENFANTS < 1 an	SANG DE CORDON et NOUVEAU-NE (< 24 h)
Ng, DONNELL, BERGREN (275) 1965	0,170 à 0,380	0,320 à 0,750	0,450 à 1,100
GITZELMANN (152)	0,179 à 0,359 $m=0,260 \pm 0,077$		
MATHAI, BEUTLER (254) 1968			3 à 4 fois l'ac- tivité adulte
MAYES, GUTHRIE (257) 1968	0,234 à 0,591 $m = 0,355$		
RESULTATS PERSONNELS	0,177 à 0,241 $m=0,219 \pm 0,042$	0,218 à 0,666	0,524 à 0,986 $m = 0,683$

TABLEAU 9 : Activité de la galactokinase érythrocytaire
(U.I./ml G.R.)

par NG (275) et GITZELMANN (151) ; elles sont un peu inférieures à celles proposées par MAYES et GUTHRIE (257) (Tableau 9).

. Enfants

La galactokinase est une enzyme prédominante chez le jeune enfant, vraisemblablement adaptée à l'alimentation lactée.

Chez le nouveau-né, la moyenne d'activité est environ trois fois supérieure à la valeur adulte selon nos résultats et ceux de NG (275).

On assiste à une diminution graduelle de l'activité avec l'âge.

Selon NG (275), les valeurs adultes sont atteintes entre trois et six ans. Si l'on en croit nos déterminations réalisées sur un nombre d'enfants à peu près égal au groupe testé par NG mais insuffisant pour tirer des conclusions définitives, la normalisation de l'activité galactokinase au niveau adulte serait atteinte au cours de la deuxième année de la vie (Figure 5).

Quoi qu'il en soit, nous devons insister sur le fait que cette variabilité importante avec l'âge rend indispensable, lors de la recherche du déficit, la comparaison de l'activité du malade avec celle d'un témoin de même âge, et à défaut avec l'échelle des valeurs obtenues avec la même technique chez des enfants d'âges divers.

. Sang du cordon

Mesurée à partir des hématies de vingt sangs du cordon recueillis en milieu obstétrical au cours d'accouchements normaux à terme, l'activité de la galactokinase est trouvée très augmentée allant de 249 à 451 %, soit en moyenne 320 % de la valeur moyenne adulte (Figure 8).

Des résultats voisins, trois à quatre fois plus active que l'enzyme adulte, avaient été rapportés en 1967 par MATHAI et BEUTLER (254) sans

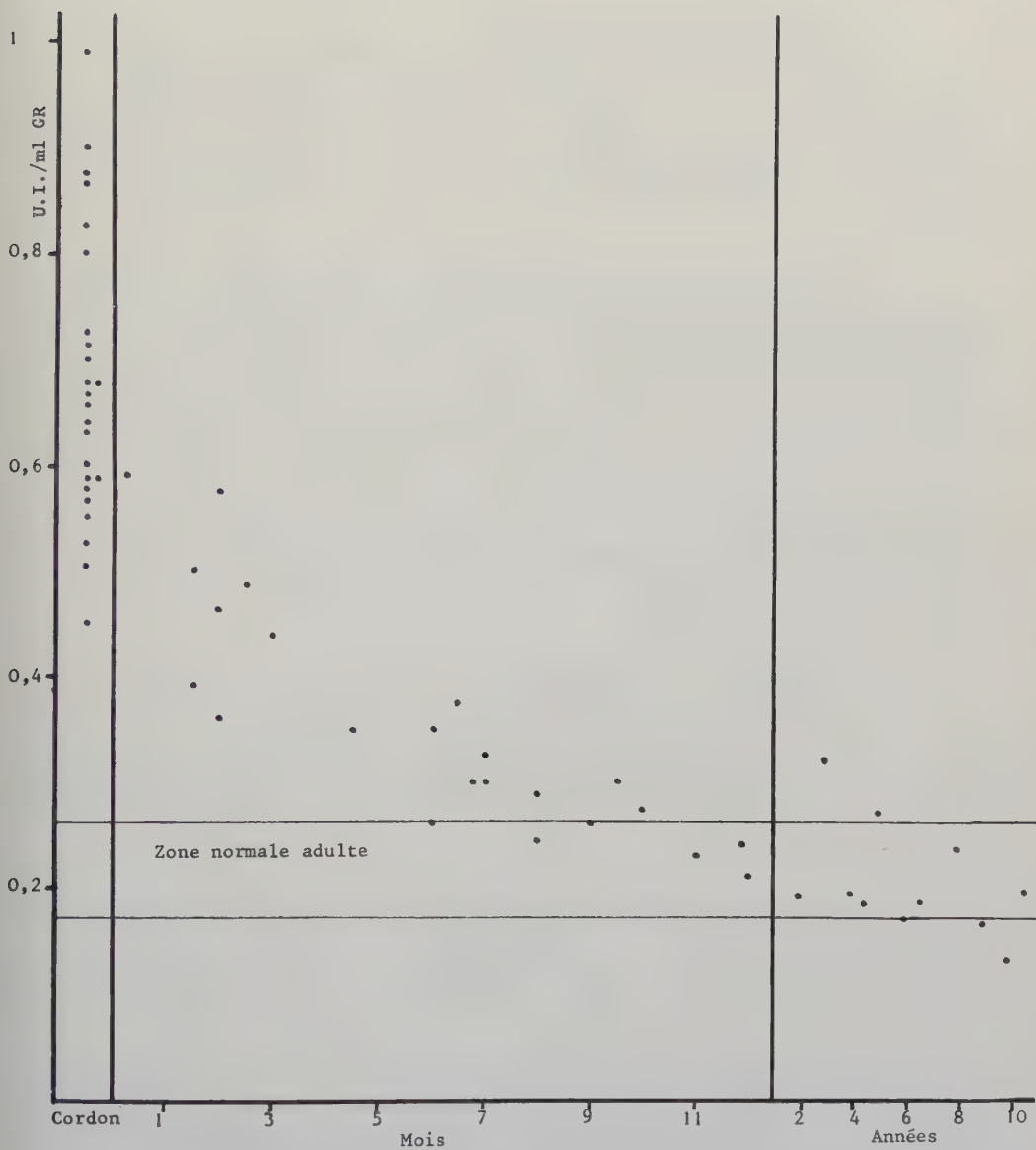


FIGURE 5 : Evolution de l'activité de la galactokinase chez l'enfant

toutefois énoncer de valeurs chiffrées.

β - Influence des réticulocytes

Pour éliminer une éventuelle intervention des réticulocytes et des hématies jeunes dans la forte augmentation de l'activité galactokinase chez le jeune enfant, nous avons exprimé l'activité enzymatique chez 75 témoins ou malades, adultes et enfants en fonction du taux des réticulocytes (Figure 6).

La dispersion des résultats obtenus ne démontre aucune concordance apparente entre la réticulocytose et l'activité de la galactokinase. Des activités enzymatiques sont trouvées normales alors que le pourcentage de réticulocytes atteint 4 et même 6 % ; inversement, l'activité de la galactokinase est très augmentée tandis que la réticulocytose est normale.

Il semble donc que la forte élévation d'activité de la galactokinase durant les premiers mois de la vie ne soit pas la conséquence de la présence des cellules jeunes.

γ - Influence de la conservation.

La labilité des activités enzymatiques demeure une importante cause d'erreur dans l'appréciation des résultats en enzymologie; nous avons évalué les pertes d'activité subies par la galactokinase lors de sa conservation.

Les essais de conservation, à partir de sangs témoins prélevés sur héparine, ont été conduits sous différentes formes (sang total, globules rouges lavés, hémolysats) et à deux températures (+ 4°C et congélation à - 20°C).

Conservée à + 4°C, sous forme d'hémolysat, la perte de l'activité enzymatique se situe aux environs de 20 % après la vingt-quatrième heure, tandis qu'aucune activité n'est retrouvée après une semaine.

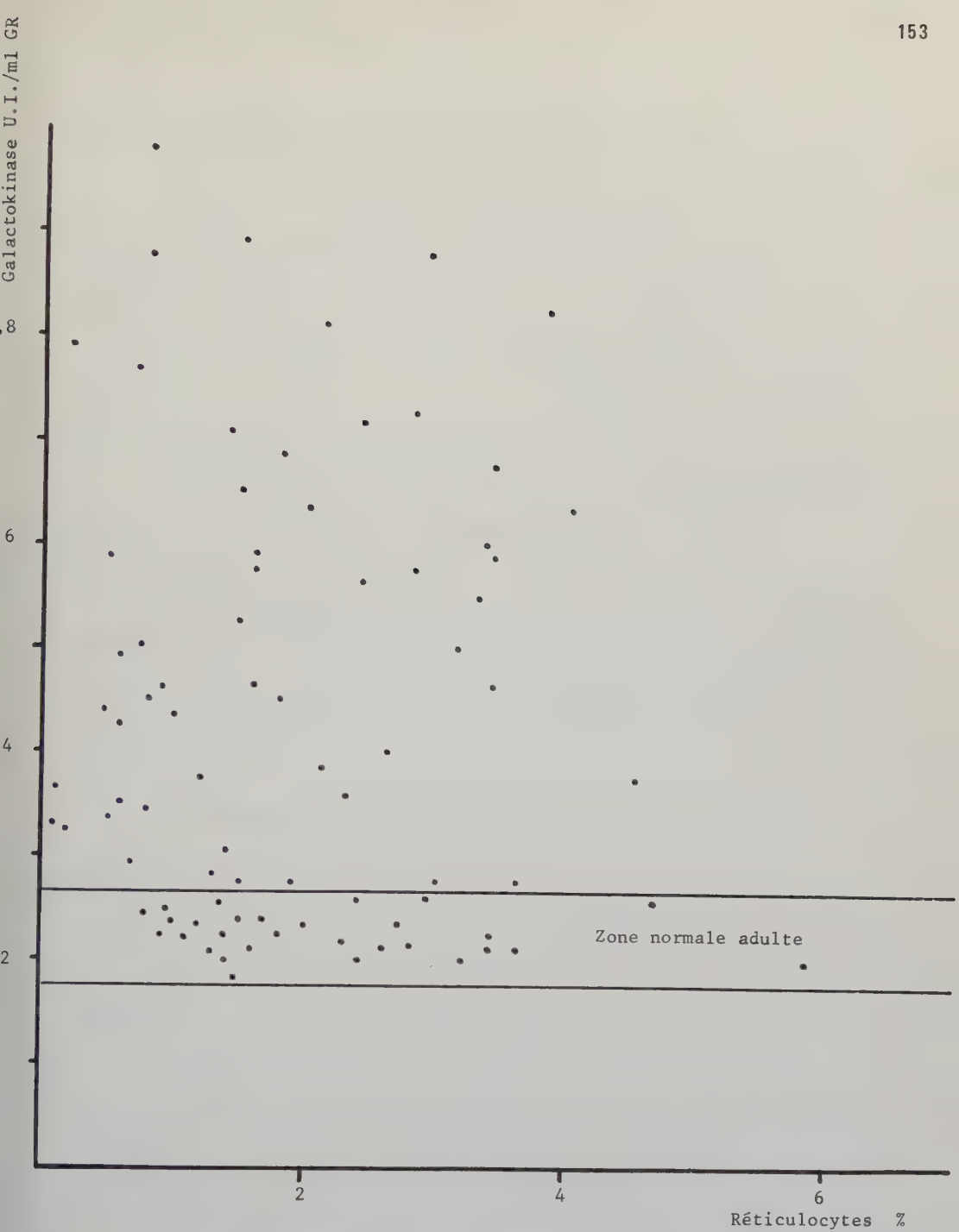


FIGURE 6 : Activité de la galactokinase en fonction de la réticulocytose

La perte d'activité est encore plus intense si la conservation a lieu par congélation à $- 20^{\circ}\text{C}$ d'un hémolysat ou de globules lavés.

Au contraire, la galactokinase présente une stabilité presque parfaite lorsque le sang total ou les globules rouges lavés sont conservés à $+ 4^{\circ}\text{C}$. Dans ces conditions, où l'intégrité du globule rouge est maintenue, l'activité de l'enzyme ne diminue que légèrement durant une période de conservation de six à sept jours.

Des essais semblables rapportés par MAYES et GUTHRIE (257) d'une part, NG (275) d'autre part, ont conduit à des résultats équivalents.

Dans un but pratique, ces résultats démontrent que la conservation de l'activité enzymatique, donc le transport éventuel d'un prélèvement, est possible à condition de maintenir l'intégrité des hématies, une température voisine de $+ 4^{\circ}\text{C}$ et d'éviter soigneusement de soumettre le prélèvement à la congélation.

II - MESURE DE LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DE LA GALACTOKINASE.

Devenue une technique courante de l'étude du polymorphisme génétique des enzymes, la mesure de la mobilité électrophorétique représente actuellement l'un des meilleurs critères de définition des variantes anormales des enzymes érythrocytaires.

Parmi les nombreuses méthodes déjà décrites, aucune à notre connaissance n'a été proposée pour étudier la mobilité et le comportement électrophorétiques de la galactokinase.

Nous nous sommes donc attachés à définir une méthode nouvelle applicable à la galactokinase érythrocytaire.

a) Principe

L'électrophorèse est conduite en gel d'amidon à pH 7 à partir d'hémolysat concentré ; la révélation spécifique de la galactokinase repose sur le principe que nous avons défini pour la mesure de l'activité enzymatique et utilise l'apparition de fluorescence due au NADPH sous lumière ultra-violette.

b) Réalisation

Matériel :

- Cuve à électrophorèse réfrigérée à + 4°C (POLYPHOR - Chaix-Meca - Nancy)
- Source de lumière ultra-violette (MAZDA 125 W - MAW)

Réactifs :

- Tampon "cuves" phosphate potassique 0,1 M, pH 7,0.

$K_2 H PO_4$	8,57 g
$K H_2 PO_4, 3 H_2O$	5,96 g
Eau distillée	Q.S.P. 1000 ml

- Tampon "gel" phosphate potassique 0,01 M, pH 7,0.

Diluer le tampon "cuves" au 1/10ème dans l'eau distillée.

- Amidon hydrolysé (Connaught)

- Réactif de révélation

Les réactifs sont les mêmes que ceux destinés à la mesure spectrophotométrique de l'activité enzymatique.

Mg Cl ₂ (600 mM/l)	50 µl
NADP (15 mM/l)	100 µl
Phosphohexomutase (2 mg/ml - Boehringer)	5 µl
Galactose-1-P-uridyltransférase (2mg/ml Boehringer)	5 µl
G-6PD (2 mg/ml - Boehringer)	5 µl
ATP (52,5 mM/l)	200 µl
Galactose (600 mM/l)	500 µl

Technique

α - Electrophorèse

Support : gel d'amidon à 12 % dans le tampon "gel"

Hémolysat : Préparer un hémolysat contenant environ 5 g % en hémoglobine et ajouter 20 µl de NADP (15 mM) par ml d'hémolysat.

Dépôt : Déposer 20 µl d'hémolysat sur un petit rectangle (5 x 18 mm) de papier Arches 301 que l'on introduit dans le gel, à l'aide d'une pince, en le glissant contre une lamelle de verre (20 x 20 mm) préalablement insérée perpendiculairement au gel.

Migration : 16 heures à 4 volts/cm.

β - Localisation de l'activité enzymatique

- découper le gel longitudinalement en 2 gels de même épaisseur

- déposer le réactif de révélation sur l'une des faces
- ne pas omettre de contrôler la spécificité de la réaction en déposant un réactif de révélation sans galactose sur l'une des bandes
- placer les gels en chambre humide à 37°C
- observer l'apparition d'une zone fluorescente sous lumière ultra-violette après un temps variable de développement (60 à 120 mn environ) - et mesurer la mobilité.

c) Discussion

α - Conditions de l'électrophorèse

Support :

L'électrophorèse des enzymes est réalisable sur différents supports (acétate de cellulose, agar, gel d'amidon, gel de polyacrylamide, etc...).

Nous avons choisi le gel d'amidon pour plusieurs raisons :

- l'excellent pouvoir de séparation habituellement reconnu à ce support
- la révélation lente de la galactokinase, en raison de sa faible activité, s'accommode mal d'un support qui sèche et se déforme rapidement tel que l'acétate de cellulose
- la possibilité de varier la concentration du gel en amidon
- l'obtention de deux bandes de gel après découpage longitudinal, ce qui autorise la révélation d'autres activités enzymatiques dans les mêmes conditions de migration (Hexokinase, G-6PD, galactose-1-phosphate uridyl-transférase, etc...)
- la grande habitude que nous avons au laboratoire de l'électrophorèse en gel d'amidon depuis plusieurs années.

pH :

La réalisation de l'électrophorèse à pH 7 a le grand avantage de contraindre l'hémoglobine à migrer à l'inverse de l'enzyme, évitant ainsi

une purification préalable de l'hémolysat, et une interférence de la tache d'hémoglobine lors de la révélation de l'activité enzymatique.

β - Conditions de la révélation

Mode de révélation

Deux techniques sont utilisables, l'appréciation d'une fluorescence due à l'apparition d'un coenzyme pyridinique réduit, ou celle d'un précipité de formazan résultant de la réduction du coenzyme pyridinique couplée avec celle d'un sel de tétrazolium par l'intermédiaire d'un transporteur d'hydrogène.

Les deux méthodes sont théoriquement applicables à la révélation de l'activité de la galactokinase, mais la formation de NADPH nécessitant déjà la mise en oeuvre de quatre systèmes enzymatiques et l'activité enzymatique révélée étant de faible intensité, nous avons préféré observer la fluorescence du NADPH.

C'est d'ailleurs la technique retenue par d'autres auteurs lors de la révélation d'activité enzymatique également faible (40 - 332).

Notons toutefois qu'une intensification de la fluorescence peut être facilement obtenue par addition de 6-phosphogluconate déshydrogénase (254-359).

Validité

Elle est démontrée de façon irréfutable par l'absence totale de fluorescence lorsque l'électrophorèse est révélée par un réactif sans galactose (Figure 7).

d) Résultats

L'apparition de fluorescence intervient après un temps d'incubation variable allant de 60 à 120 mn environ.

Adultes

Dans les conditions de l'électrophorèse, c'est-à-dire en gel d'amidon à pH 7, sous 4 Volts/cm durant 16 heures, la galactokinase apparaît sous forme d'une seule bande de fluorescence située environ à 25 mm du dépôt chez l'adulte normal (Figure 7).

Il est important de noter que la galactokinase ne présente à l'électrophorèse qu'une seule bande d'activité enzymatique.

Il s'agit là d'une donnée nouvelle concernant l'étude de cette enzyme ; elle concorde bien avec les résultats de MATHAI et BEUTLER (254) qui n'observaient qu'un seul pic d'activité par chromatographie sur colonne de l'enzyme partiellement purifiée.

Sang du cordon

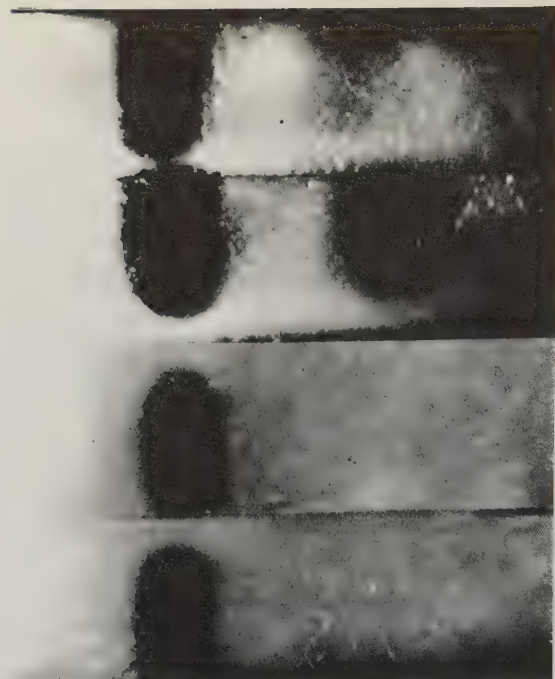
L'électrophorèse d'hémolysats de sang du cordon, réalisée parallèlement à celle d'hémolysats adultes montre incontestablement une mobilité électrophorétique accrue pour l'enzyme du cordon.

Mais il n'est pas possible de distinguer deux bandes de fluorescence.

Il nous semble intéressant de rapprocher ces données des résultats obtenus antérieurement par MATHAI et BEUTLER d'une part, CUATRECASAS et SEGAL d'autre part.

MATHAI et BEUTLER (254) travaillant sur du sang adulte et du sang de cordon, n'ont pu différencier l'enzyme du cordon de l'enzyme adulte par chromatographie, mais ils rapportent une constante de Michaelis pour le galactose dénotant une affinité légèrement différente de la galactokinase du cordon et de l'enzyme adulte.

Pour leur part, CUATRECASAS et SEGAL (110) rapportent des proprié-



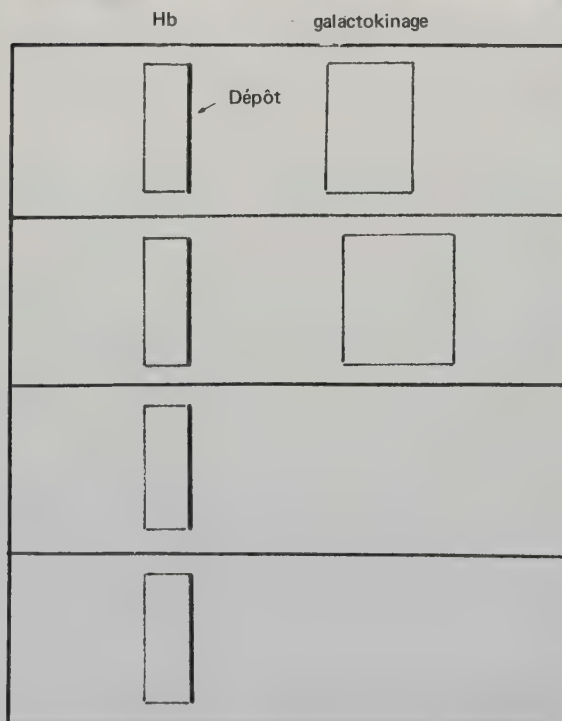
Adulte

Cordon

Révélation sans ATP

Révélation sans galactose

MAZDA 125 W - MAW - Film orthochromatique 6 ASA, développement révélateur papier classique, temps de pose rigoureux (Phot' Antik - Nancy)



Adulte

Cordon

Révélation sans ATP

Révélation sans galactose

FIGURE 7 : Mobilité électrophorétique de la galactokinase en gel d'amidon pH 7 (Révélation par mise en évidence de la fluorescence du MAU). Photographie réalisée sous lumière ultra-violette)

tés différentes pour l'enzyme hépatique adulte et l'enzyme foetale du rat, en particulier au niveau de la K_m galactose ; ils émettent l'hypothèse de l'existence de deux galactokinases distinctes dans le foie de rat, dont l'une serait prédominante durant la période foetale.

Nos travaux, par le biais de l'électrophorèse, semblent pouvoir démontrer qu'il existe bien une particularité de la galactokinase foetale puisque la molécule possède une charge différente. Par contre, l'observation d'une seule bande fluorescente chez l'adulte ou dans le sang du cordon n'est pas en faveur de l'hypothèse de CUATRECASAS et SEGAL et ne permet pas de démontrer l'existence de deux formes distinctes adulte et foetale.

III. - MESURE DE LA CONSOMMATION DU GALACTOSE "IN VITRO".

Pour mesurer la consommation du galactose par les hématies in vitro, nous avons adapté au galactose les conditions de mesure de l'activité glycolytique utilisées par CARTIER (87).

a) Principe

Les hématies lavées en suspension dans le soluté de KREBS-RINGER à pH 7,4, sont agitées d'un mouvement continu pendant 3 heures à 37°C ; le galactose est déterminé par voie enzymatique avant et après incubation. L'activité galactolytique est exprimée en μ moles de galactose consommé par heure par ml de globules rouges.

b) Réalisation

Si le principe du test est simple, sa réalisation demande une standardisation rigoureuse des conditions d'incubation pour être reproductible.

Matériel

Agitateur mécanique placé dans une étuve à 37°C ou agitateur de Dubnoff.

Réactifs

- Liquide de Krebs-Ringer modifié pH 7,4

Na Cl	0,672 g
K Cl	0,030 g
Mg Cl ₂ , 6 H ₂ O	0,102 g
Na ₂ H PO ₄ , 2 H ₂ O	0,288 g
Na H ₂ PO ₄ , 2 H ₂ O	0,052 g
Galactose	0,180 g
Eau distillée.....	Q.S.P. 100 ml
Ajuster à pH 7,4	

Préparation extemporanée.

- Réactifs nécessaires au dosage spécifique du galactose au moyen de la galactose déshydrogénase (Galactose U.V. Test - Boehringer).

- Acide perchlorique 0,33 N

H Cl O₄ 70 % (Fluka) 2,85 ml

Eau distillée Q.S.P. 100 ml

Technique

Traiter le sang "malade" et un sang "témoin" dans des conditions strictement identiques.

α - Recueillir le prélèvement sur héparine.

β - Eliminer le plasma et laver les hématies à plusieurs reprises avec du soluté physiologique.

γ - Déterminer le pourcentage d'hématies du culot globulaire lavé.

δ - Incubation :

- Placer dans deux tubes en polyéthylène (Dosage et témoin) :

. Globules rouges lavés 1 ml

. Liquide de Krebs 1 ml

- Agiter par retournements

- Prélever aussitôt 0,2 ml du mélange que l'on défèque immédiatement avec 1 ml d'acide perchlorique 0,33 N. Conserver le défécât pour la mesure du taux de galactose initial.

- Disposer les deux tubes sur le système d'agitation placé à 37°C. Agiter durant trois heures.

- Après trois heures exactement, prélever 0,2 ml de chaque tube que l'on défèque immédiatement.

c - Détermination spécifique du galactose (Galactose U.V. Test - Boehringer)

ζ - Calcul

Exprimer l'activité galactolytique en μM de galactose consommé par ml de globules rouges par heure.

c) Résultats et discussion

Les résultats obtenus chez des témoins adultes et enfants (Tableau 10) montrent que l'utilisation du galactose par les hématies du nouveau-né est environ trois fois supérieure à la consommation de l'adulte (alors que l'utilisation du glucose est semblable).

Témoins adultes	0,255	0,166	0,266	0,211	0,166	0,305	0,286	0,158	0,490	0,205
Témoins enfants (0 à 6 mois)	0,683	0,938	0,670	0,672	0,861	0,927	1,088	0,827	0,683	0,750

Tableau 10 : Activité galactolytique (μM galactose consommé par ml GR/heure)

L'intérêt de cette mesure réside dans le parallélisme assez évident qui semble exister entre l'intensité de la consommation du galactose in vitro et l'activité de la galactokinase ; cette notion contribue à consolider les travaux de CUATRECASAS et SEGAL (110) qui attribuaient à la galactokinase, premier maillon du métabolisme du galactose, un rôle de régulateur.

Dans la mesure où cette hypothèse paraît vraisemblable, la mesure de la consommation du galactose in vitro peut servir de contrôle grossier à la mesure de l'activité de la galactokinase érythrocytaire.

CHAPITRE III - ACTIVITE ENZYMATIQUE DU SANG DE CORDON.

PARTICULARITES DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE.

C'est un fait bien connu que la physiologie néo-natale présente une individualité très accusée ; nombreuses sont les constantes biologiques qui la caractérisent et diffèrent de celles de l'adulte. Du point de vue hématologique, le contraste le plus frappant est sans doute la présence chez le nouveau-né d'un fort pourcentage d'hémoglobine foetale nettement différente de celle des hématies de l'adulte, mais des différences importantes affectent également le profil enzymatique. L'activité métabolique apparaît dans son ensemble notablement accrue.

I. - ACTIVITES ENZYMATIQUES DU SANG DE CORDON.

La mesure des activités enzymatiques a été réalisée à partir de sang du cordon recueilli en milieu obstétrical au cours d'accouchements normaux à terme.

a) Résultats (Figure 8)

Un classement arbitraire des résultats permet de distinguer trois catégories en fonction de l'amplitude des variations observées par rapport aux activités normales adultes :

- des activités enzymatiques très augmentées pour lesquelles l'ensemble des résultats est situé au-dessus de la limite supérieure adulte. Outre la galactokinase, elles comprennent la phosphohexomutase, l'hexokinase, la phosphoglycératemutase, l'énolase, la pyruvate-kinase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

- des activités enzymatiques que l'on peut considérer comme normales puisque la moyenne des valeurs obtenues ne s'écarte pas ou peu des limites supérieure ou inférieure normales de l'adulte. Ainsi la phosphohexoisomérase

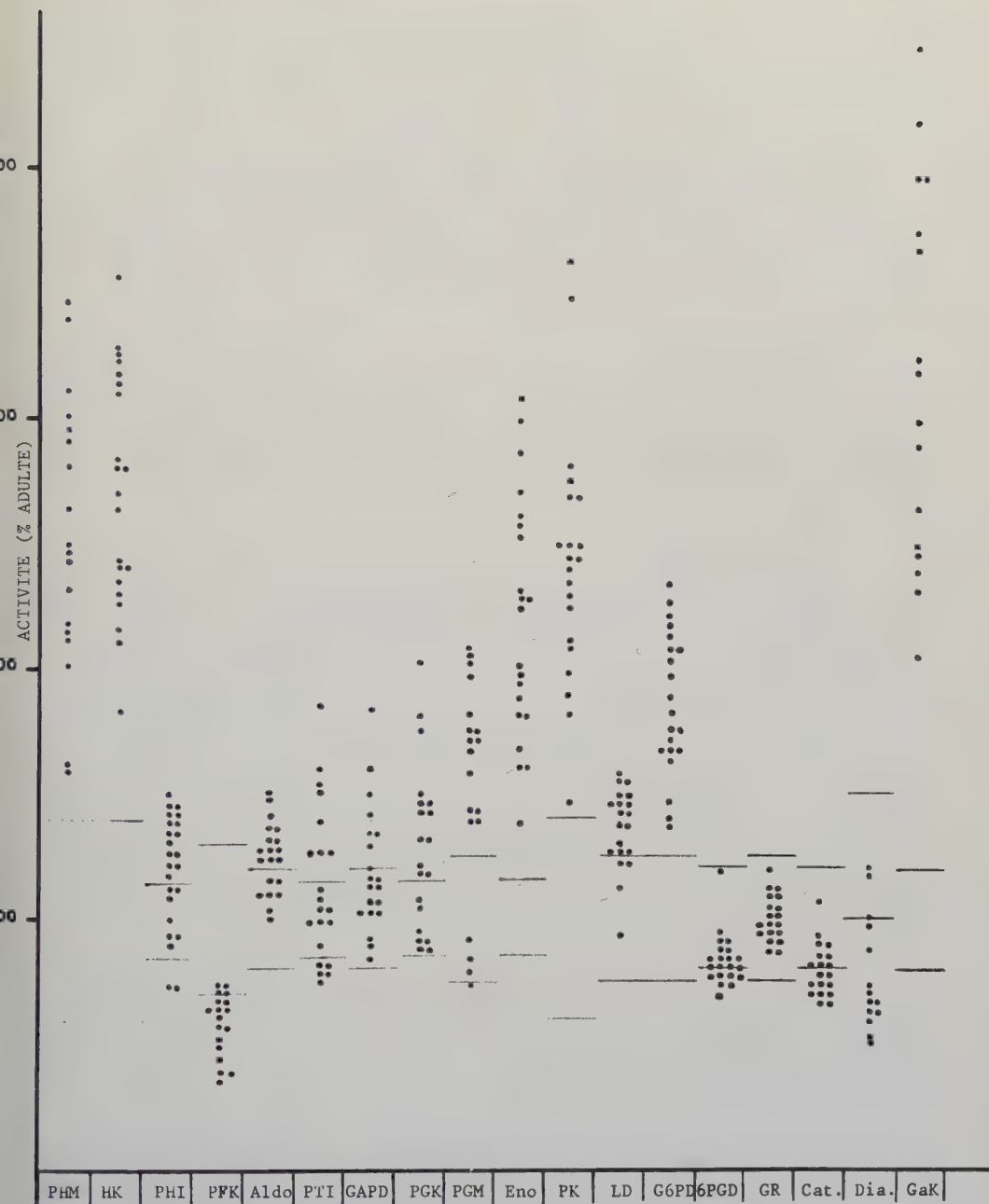


Figure 8 : Activités enzymatiques du sang de cordon exprimées en % des valeurs moyennes adultes

se, l'aldolase, la glycéraldéhyde-phosphate-déshydrogénase se trouvent augmentées, tandis que la 6-phosphogluconate déshydrogénase, la glutathion-réductase, et la catalase sont normales ou abaissées.

- des activités enzymatiques nettement diminuées. Elles sont au nombre de deux, la phosphofructokinase et la NADH-méthémoglobine réductase, pour lesquelles la majorité des résultats se situe bien au-dessous de la normale adulte.

b) Discussion

L'obligation d'admettre dans la présente discussion la parfaite identité entre le sang de cordon et celui du nouveau-né, et la diversité des conditions expérimentales de chacun rendent difficile la comparaison des résultats obtenus avec ceux d'autres auteurs (Tableau 11).

Dans leur ensemble, nos résultats s'accordent assez bien avec les valeurs déjà signalées (11 - 161 - 231 - 233 - 243 - 283 - 284 - 366) ; les variations observées s'effectuent presque toujours dans le même sens, mais il convient cependant de souligner quelques discordances. Elles concernent, d'une part la phosphohexomutase que nous trouvons toujours augmentée alors que BARTHELMAI (11) et COTTE (108) rapportent une activité peu augmentée ou diminuée chez le nouveau-né, d'autre part, la 6-phospho-gluconate-déshydrogénase et la glutathion réductase. Les activités de ces deux enzymes nous sont apparues diminuées ou normales, alors qu'elles sont décrites augmentées parfois même dans de larges proportions par différents auteurs (11 - 244 - 366).

Les larges variations des activités enzymatiques du sang du cordon, et du nouveau-né, comparées aux valeurs normales adultes, appellent quelques commentaires d'ordre pratique et théorique :

1° - L'interprétation des résultats d'un bilan enzymatique pratiqué chez un nouveau-né ou un nourrisson devra obligatoirement tenir compte du sens des variations observées, et en particulier ne pas considérer comme un

		DI TORO (1961)	Mc DONALD (1962)	GRUSS (1963)	ROSS (1963)	SWIERCZENSKI (1965)	MADEC (1966)	COITE (1967)	BARTHELMAI (1968)	OSKI (1969)	RESULTATS PERSONNELS
	Hématies		cordon	N.N.	cordon	cordon	cordon	N.N.	N.N.	N.N.	cordon
	Nombres d'essais		30	12	54	15	20	10		10	21
	Réticulocytes %						4,6			5,3	2,1
PHM	Phosphohexomutase							↘	105		252
HK	Hexokinase			182				↗	134	263	277
PHI	Phosphohexoisomérase							↗↗	137		125
PFK	Phosphofructokinase			74				↘		56	45
Aldo	Aldolase			164			158	↗	152	175	126
PTI	Phosphotrioseisomérase								111	111	113
GAPD	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase							↗	174	100	119
PGK	Phosphoglycératokinase			139				↗↗	155	140	127
PGM	Phosphoglycératemutase							↗↗	215	139	153
Enol	Enolase							↗	196	205	220
PK	Pyruvate kinase			132			162	↗	258	143	244
LD	Lactico-déshydrogénase		100				158	↗	145	135	140
G6PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase		124			186	225	237	182	152	186
6PGD	6-Phosphogluconate-déshydrogénase							↗	154		81
GR	Glutathion réductase		162			151	153	↗	135		100
	Catalase	100					100				82
	NADH MetHb-réductase		90		57						73

TABLEAU 11 : Activités enzymatiques du sang du cordon et du nouveau-né

déficit, sans l'avoir comparé à un témoin de même âge, une diminution en phosphofructokinase ou en NADH-méthémoglobine réductase.

2° - La déficience relative de la NADH-méthémoglobine réductase est probablement responsable de la susceptibilité inhabituelle des jeunes enfants à former de la méthémoglobine ; la moyenne d'activité des sangs du cordon, que nous avons étudiés, se situe dans les limites proposées par SCOTT (347) pour définir les porteurs hétérozygotes de la tare, mais la sévérité du déficit apparaît très variable d'un échantillon à l'autre.

Des cas d'immaturité enzymatique transitoire par déficit en diaphorase ont souvent été rapportés dans la littérature (226) ; nous avons récemment eu l'occasion de faire l'étude biochimique d'un cas semblable et d'assister à son évolution (Tableau 12).

On a cru longtemps que les déficits en diaphorase NADH dépendante résultaient d'une déficience primitive de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, étape responsable de la génération du NADH. Les résultats que nous obtenons, comme les valeurs rapportées antérieurement par d'autres, démontrent que cette hypothèse ne peut être retenue, car l'activité de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase se trouve plutôt augmentée dans le sang du cordon et chez le nouveau-né (161 - 162 - 189 - 323 - 324 - 349).

3° - L'abaissement le plus accentué affecte la phosphofructokinase, alors que les travaux récents la présentent comme l'étape essentielle de la régulation de la glycolyse (87). Or, la consommation du glucose in vitro par les hématies du sang de cordon ou du nouveau-né a été démontrée identique, ou sensiblement augmentée, comparée à celle des hématies adultes!...

4° - Les importantes variations d'activité observées, dans le sens d'une augmentation ou d'une diminution, suggèrent que les hématies produites in utero et peut-être durant les premiers mois de la vie ne diffèrent pas seulement par la nature de leur hémoglobine et leur profil enzymatique, mais aussi par les propriétés physico-chimiques de leurs enzymes (159). Cette hy-

	Père	Mère	Christelle			Valeurs normales
Age (semaines)			2	6	9	
Recherche d'hémoglobine M	0	0	0			0
Méthémoglobine %	0	2,4	6,6	9,6	2,7	< 3
Activité diaphorase NADH x 10 ⁻⁴	65	45	20	25	42	> 30
G.6PD			2,3			1,96 + 0,48
6.PGD			1,4			1,31 + 0,23
Glutathion réductase			0,75			1,05 + 0,25
Catalase			476			600 + 128
Hématocrite			340			400/600
Réticulocytes %			1,2			0,5 à 2

TABLEAU 12 : Etude biochimique de COR... Christelle

pothèse trouve un appui dans les récents travaux d'OSKI (284).

Cet auteur a mesuré les activités enzymatiques des hématies du nouveau-né et les a comparées à celles de populations riches en réticulocytes d'une part, à celles de cellules jeunes séparées par centrifugation différentielle d'autre part. Les résultats qu'il obtient lui permettent de conclure que les différences observées entre le profil enzymatique des hématies du nouveau-né et de l'adulte ne peuvent être expliquées par la seule présence d'éléments jeunes.

Cette conclusion équivaut à une question : les différences d'activité observées reflètent-elles la présence de formes moléculaires multiples particulières à cette période de la vie, ou bien résultent-elles de modifications du taux de synthèse ou de la stabilité des molécules ?

C'est dans le but d'apporter quelques éléments de réponse à cette question embarrassante et attrayante à la fois que nous avons entrepris l'étude de caractères physico-chimiques de la G-6PD du sang du cordon.

II. - ETUDE PARTICULIERE DE LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE.

C'est la forte activité de l'enzyme, associée à la bonne connaissance de ses caractéristiques normales et de celles de nombreuses variantes, qui a guidé notre choix. Nous avons appliqué à l'étude des caractères physico-chimiques de la G-6PD du sang du cordon les méthodes habituellement mises en oeuvre pour définir les variantes de l'enzyme (278).

a) Méthodes

- La G-6PD a été étudiée sur les hémolysats ou à partir de préparations partiellement purifiées de l'enzyme obtenues par passage de l'hémolysat sur DEAE cellulose et précipitation par le sulfate d'ammonium (39-61-278).

- La concentration et la purification de l'enzyme est réalisée selon les premiers temps de la méthode de KIRKMAN et Coll. (209). Toutes les opérations s'effectuant à + 4°C et sont menées aussi rapidement que possible dans les conditions suivantes :

α - Préparation de l'hémolysat

20 ml de sang sont recueillis sur héparine et les hématies sont lavées plusieurs fois au soluté physiologique.

Au culot d'hématies lavées sont ajoutés 50 ml d'une solution de β-mercapto-éthanol (Fluka) 0,007 M. Après agitation, puis sédimentation, les stromas globulaires sont séparés par centrifugation.

Au surnageant, on ajoute :

Tampon phosphate 0,5 M, pH 6,3	0,16	volume
β-mercapto-éthanol	0,002	volume
Eau distillée	2,84	volumes.

β - Concentration et purification

Dans un entonnoir de Büchner de 10 cm de diamètre, sur lequel on dispose un papier filtre, on dépose 10 g (poids sec) de DEAE-cellulose (Macherey-Nagel) préalablement équilibrée en tampon phosphate 0,5 M, pH 6,3.

L'hémolysat est passé sur la DEAE-cellulose en dix minutes environ en s'aidant, si nécessaire, du vide, puis la DEAE-cellulose est lavée jusqu'à ce qu'elle soit blanche par un tampon phosphate 0,02 M, pH 6,3.

L'élution est obtenue avec deux fois 50 ml de tampon phosphate 0,5 M, pH 6,3 ; les deux éluats sont mélangés et on y ajoute du sulfate d'ammonium à raison de 43,7 g pour 100 ml, puis 5 ml EDTA 0,27 M et 1 ml de β-mercapto-éthanol.

Le mélange est agité, puis centrifugé 30 mn à grande vitesse ; le surnageant est rejeté, tandis que le précipité est mis en solution dans quelques ml de tampon triéthanolamine-EDTA pH 7,6. On mesure l'activité en-

zymatique de la solution obtenue, puis on réalise une dilution permettant d'obtenir une activité enzymatique compatible avec les conditions optimales de mesure pour une prise d'essai de 0,1 ml.

- La constante de Michaelis vis-à-vis du glucose-6-phosphate est établie selon la représentation graphique de Lineweaver et Burk à partir de concentrations finales de glucose-6-phosphate allant de 3,50 mM à 0,003 mM. Dix mesures sont réalisées pour les concentrations suivantes : 3,50 - 0,875 - 0,700 - 0,350 - 0,175 - 0,070 - 0,035 - 0,017 - 0,007 - 0,003 mM.

Les analogues structuraux du substrat (galactose-6-phosphate, 2-deoxyglucose-6-phosphate, glucose) sont utilisés à la même concentration que le glucose-6-phosphate soit 3,5 mM.

La courbe d'activité en fonction du pH est établie de pH 5 à pH 11 à chaque 0,5 degré de pH, ce dernier étant ajusté par addition de HCl ou NaOH au tampon. Les résultats sont exprimés en valeur relative, l'activité à pH 7,6 étant considérée comme égale à 100 %.

L'électrophorèse de l'enzyme est conduite à + 4°C sur acétate de cellulose (Cellogel) en tampon tris-EDTA à pH 7,5 sous 20 volts/cm durant trois heures, ou sur gel d'amidon en tampon phosphate 0,1 M à pH 7 sous 4 volts/cm durant seize heures. La caractérisation utilise la fluorescence du NADPH ou la réduction d'un sel de tétrazolium.

La stabilité est étudiée par stockage de 24 h à + 4°C et par chauffage à 45°C durant 20, 40 et 60 mn.

La fragilité osmotique est mesurée automatiquement (Fragiligraph).

Tous les essais ont été conduits parallèlement sur des témoins adultes (donneurs de sang).

b) Résultats

Activité

Rapportée à la valeur moyenne adulte, l'activité moyenne de 20 sangs de cordon s'établit à 186 %, allant de 138 à 234 %. Les valeurs rapportées dans la littérature sont de 124, 186, 225, 182, 152 %. Il faut noter que la G-6PD est selon notre étude la seule enzyme du cycle des pentoses phosphates, et de celles intervenant dans les systèmes d'oxydo-réduction de l'hématie, à présenter une activité augmentée par rapport aux hématies adultes.

Affinité pour le glucose-6-phosphate (K_m G-6P) (Fig. 9)

La constante de Michaelis vis-à-vis du glucose-6-phosphate, déterminée sur les hémolysats ou sur les préparations d'enzymes partiellement purifiées, s'intègre dans les valeurs normales adultes de notre laboratoire ($39 \pm 7 \mu M$ G-6P).

Activité vis-à-vis des analogues structuraux du substrat (Fig. 10)

Pour les trois analogues testés, galactose-6-phosphate, 2-deoxy-glucose-6-phosphate et glucose, l'enzyme du cordon montre une plus large dispersion des résultats, allant plutôt vers une affinité plus grande pour les analogues. Ceci est surtout vrai pour le 2-deoxy-glucose-6-phosphate et pour le glucose. L'enzyme du cordon apparaît donc moins spécifique que l'enzyme adulte.

Stabilité de l'activité enzymatique (Fig. 11)

Conservé 24 heures à $+4^\circ C$, la perte d'activité de l'hémolysat de sang de cordon est moindre que celle de l'hémolysat adulte.

Les hémolysats soumis durant 60 mn à une température de $45^\circ C$ montrent une thermostabilité assez voisine. Il faut toutefois remarquer que l'activité de l'enzyme des hématies adultes décroît linéairement tandis que l'activité du sang de cordon baisse d'abord rapidement et semble se stabi-

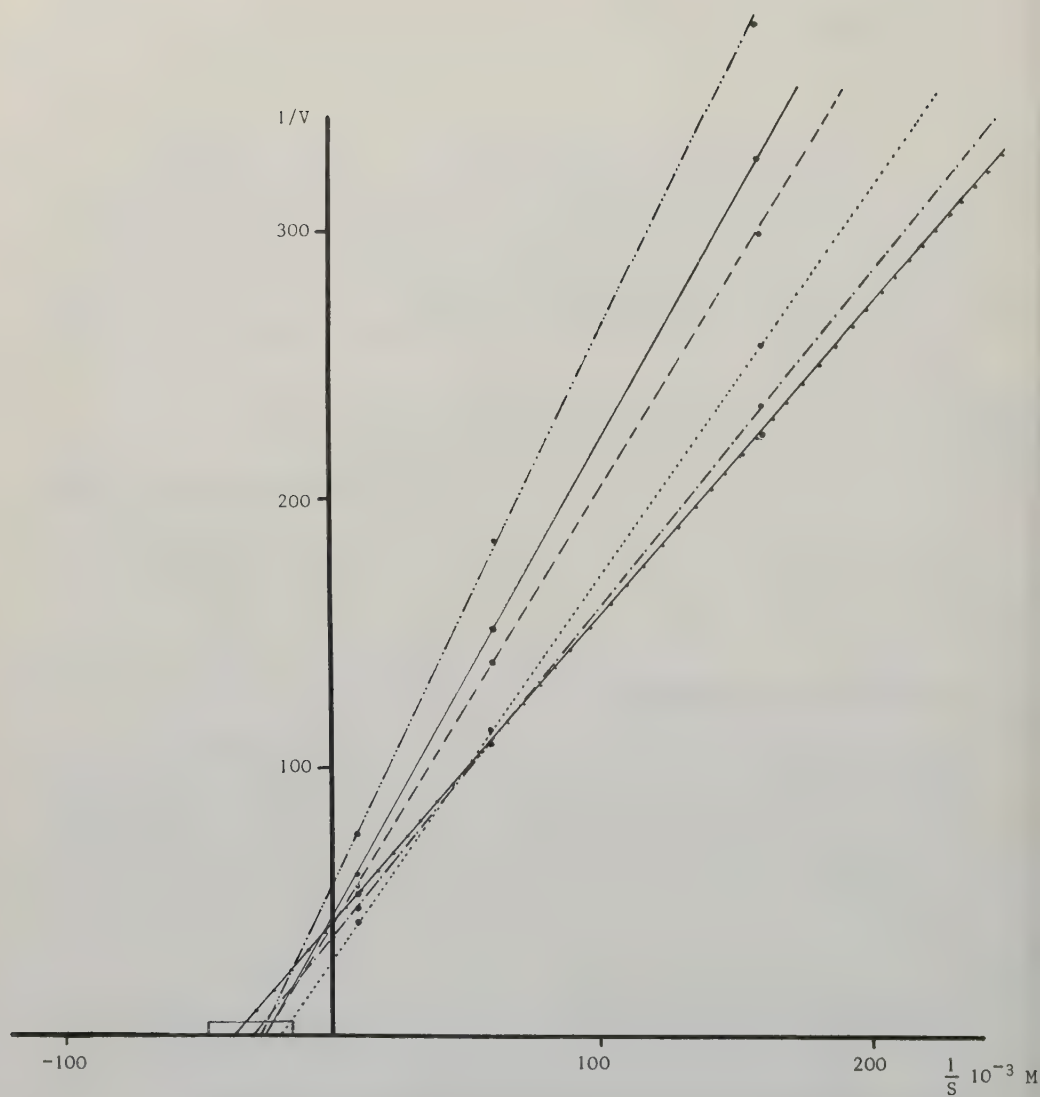


Figure 9 : G.6PD du sang de cordon : constante de Michaelis pour le glucose-6-phosphate (K_m G.6P)

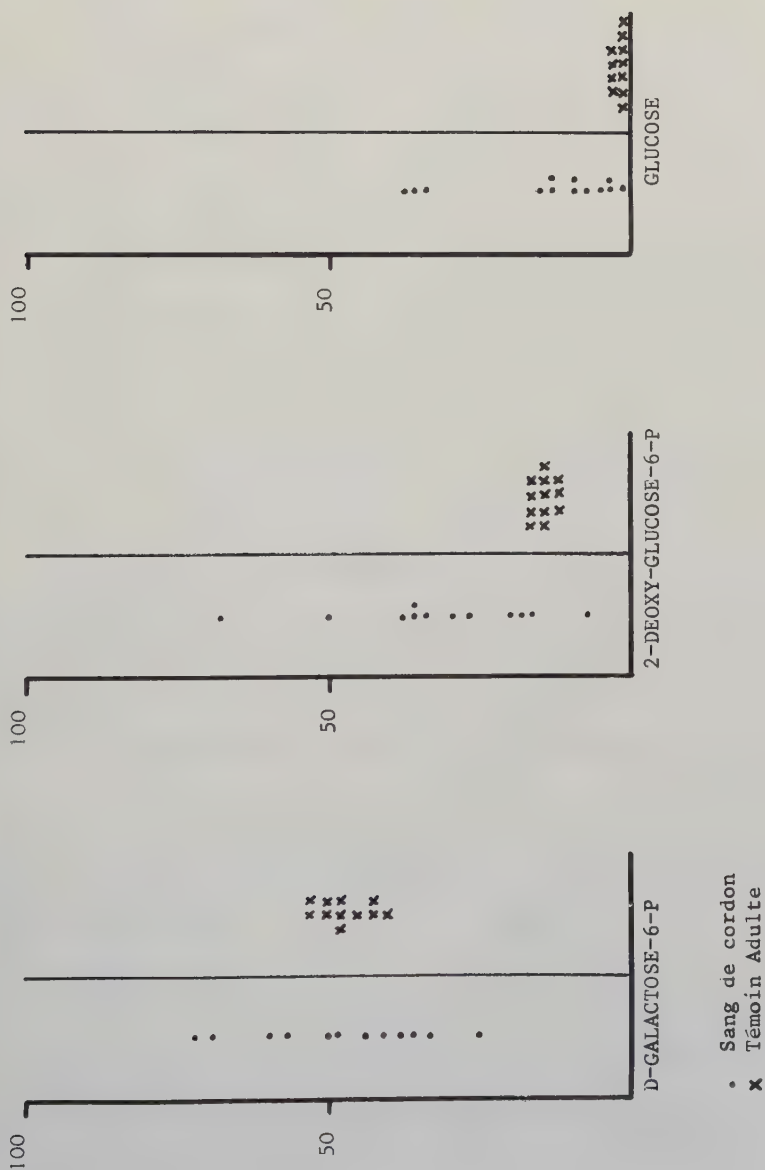
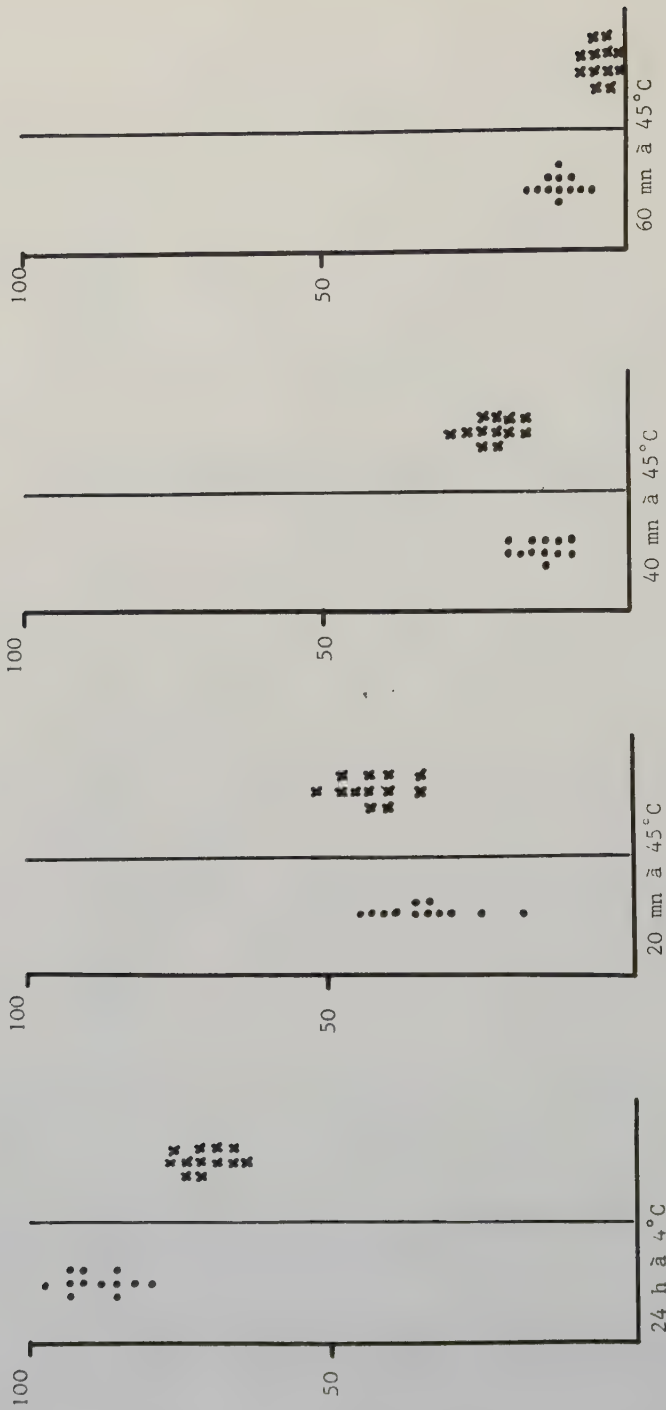


Figure 10 : G.6PD du sang du cordon. Activités relatives vis à vis des analogues structuraux du substrat



• Sang de cordon
x Témoin adulte

Figure 11 : G.6PD du sang du cordon. Stabilité de l'activité enzymatique

liser après 40 mn de chauffage.

Activité en fonction du pH (Fig. 12)

L'allure de la courbe obtenue diffère sensiblement de celle des témoins adultes ; semblable pour l'essentiel puisque le maximum d'activité se situe toujours à pH 9,5, l'enzyme de sang de cordon fait preuve d'une plus grande résistance aux variations de pH en dehors des limites physiologiques, particulièrement à pH alcalin. L'activité à pH 11 oscille entre 102 et 115%.

Mobilité électrophorétique (Fig. 13)

Sur acétate de cellulose (Cellogel, Millipore) et sur gel d'amidon, la mobilité électrophorétique de la G-6PD du sang de cordon est toujours supérieure à celle de la G-6PD adulte.

Dans les conditions employées, l'accroissement de la mobilité est plus sensible sur acétate de cellulose (21 mm de migration pour l'enzyme du cordon contre 18 mm pour l'enzyme adulte).

La détermination de la mobilité sur des gels contenant des concentrations différentes en amidon (allant de 10 à 16 g %) selon la méthode proposée par SMITHIES montre un intercept unique sur l'axe des abscisses, ce qui indiquerait pour les deux molécules enzymatiques une taille moléculaire comparable.

Bien que la précision de cette méthode soit très critiquable, les résultats obtenus laissent supposer que l'enzyme du sang du cordon serait constituée par une molécule de taille similaire à l'enzyme normale, mais modifiée dans sa charge.

c) Discussion.

En 1959, LOHR et WALLER (233) ont démontré que la plupart des enzymes glycolytiques voient leur activité décroître de manière linéaire au cours du vieillissement du globule rouge, à l'exception de la G-6PD et de la

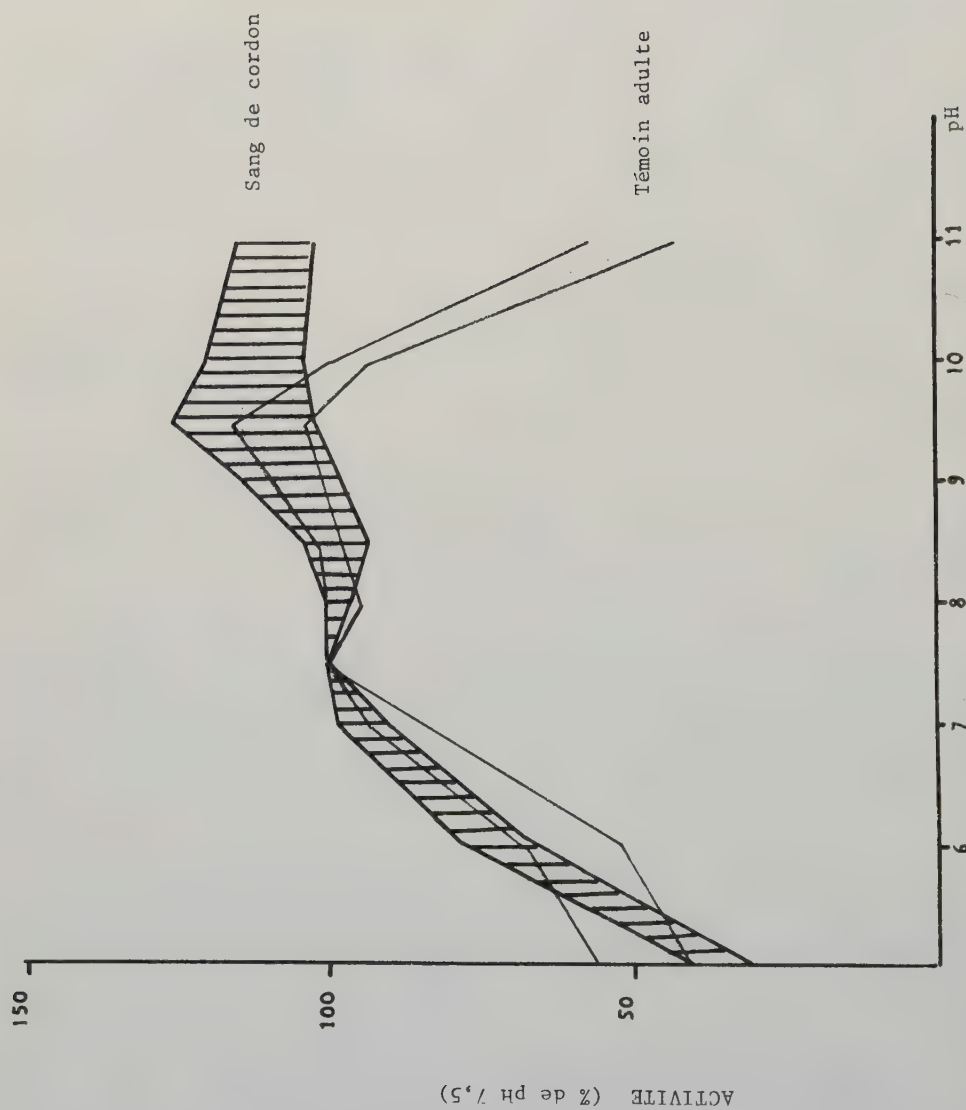


Figure 12 : G.6PD du sang du cordon. Activité en fonction du pH

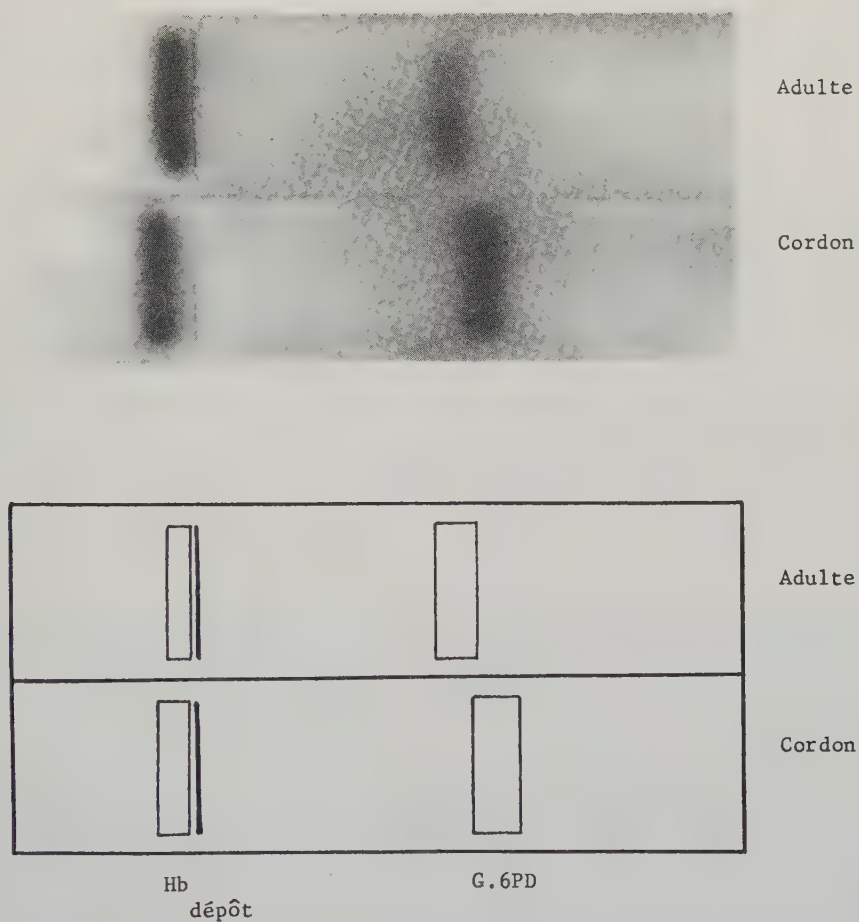


FIGURE 13 : Mobilité électrophorétique de la G.6PD en gel d'amidon, pH = 7

glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase dont les activités diminuent selon une forme exponentielle.

Il est donc tentant d'expliquer totalement l'augmentation d'activité de la G-6PD du sang de cordon par la présence d'une population érythrocytaire jeune, mais cela est difficilement démontrable puisque les études faites jusqu'alors portent, comme la nôtre, sur une population hétérogène d'hématies.

Pour apprécier la répartition des érythrocytes selon l'âge, et afin de ne pas nous contenter du seul critère cytologique de dénombrement des réticulocytes, nous avons mesuré leur fragilité osmotique au moyen d'un appareil automatique capable d'enregistrer la courbe dérivée : les courbes obtenues montrent sans ambiguïté l'existence de populations plus résistantes donc plus jeunes (figure 14), mais aussi l'absence de parallélisme entre le pourcentage d'éléments jeunes et l'augmentation de l'activité enzymatique. Ce manque de corrélation a été souvent démontré dans le sens d'une augmentation ou d'une diminution d'activité pour d'autres enzymes (283 - 284 - 357 - 386).

Les résultats que nous avons obtenus permettent-ils de dire si l'augmentation d'activité est le témoin d'une réelle modification quantitative ou qualitative de la molécule protéique ou si elle est la traduction d'un système d'activation ?

Les propriétés de l'enzyme du cordon la font rapprocher de deux variantes connues pour leur activité supérieure à la normale : la variante Hartford (112) et surtout la variante Hektoen (112).

Cette dernière, décrite par DERN, Mc CURDY et YOSHIDA (112) en 1969, possède une activité quatre fois supérieure à la normale et les caractères physico-chimiques de l'enzyme normale B+. Son seul critère de distinction consiste en une mobilité électrophorétique en gel d'amidon supérieure à celle de l'enzyme B+ en tampon phosphate à pH 6,5. Malgré cette particularité,

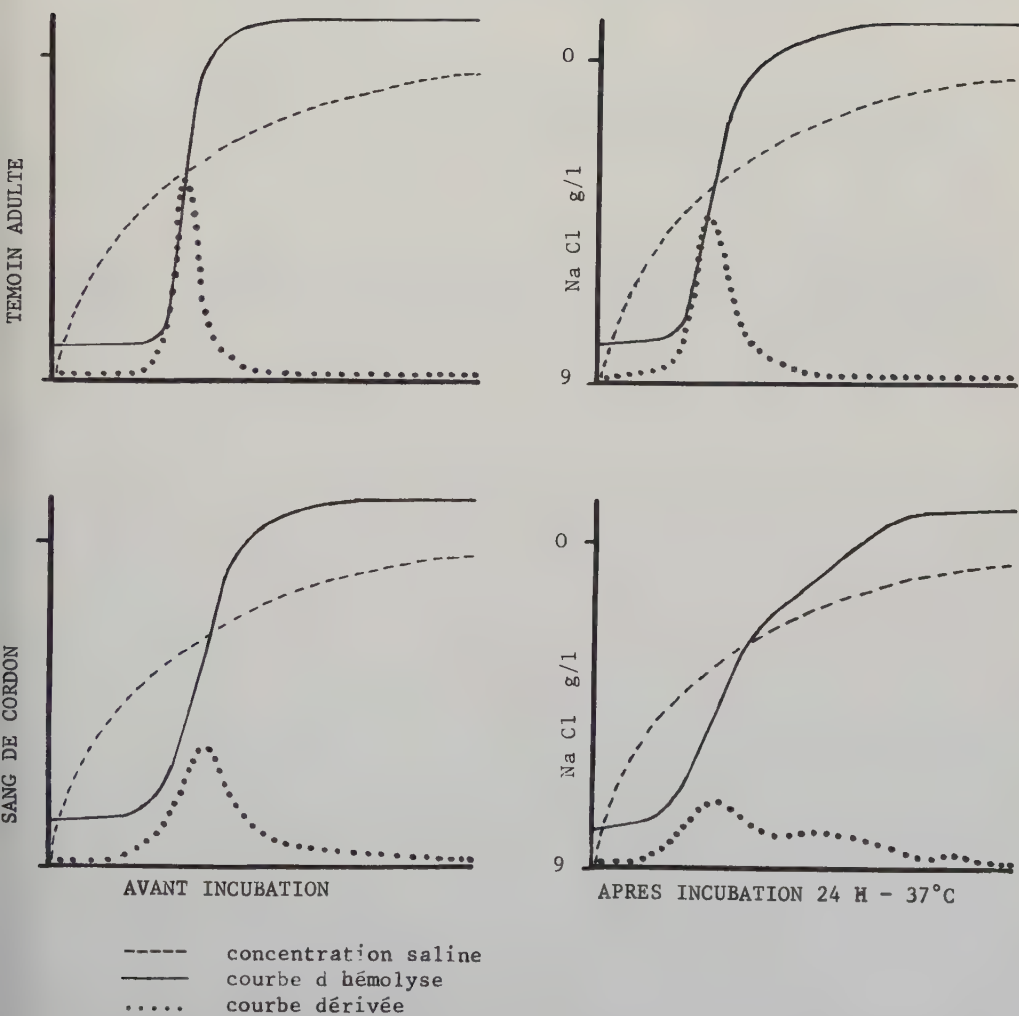


Figure 14 : Fragilité osmotique des hématies adultes et des hématies du cordon (Fragiligraph)

elle diffère de l'enzyme du cordon, puisque l'électrophorèse à pH 7 ne permet pas de la séparer de l'enzyme normale adulte et que son activité vis-à-vis des analogues structuraux du substrat d'une part, en fonction du pH d'autre part, n'est pas modifiée.

Compte tenu de sa différence de mobilité électrophorétique, donc de charge, l'enzyme du cordon apparaît comme une molécule particulière différente de la molécule adulte par au moins un critère.

A l'inverse, la spécificité moins rigoureusement définie de l'enzyme (analogues structuraux du substrat, activité en fonction du pH), la Km G-6P identique à celle de l'enzyme adulte plaident en faveur d'une immaturité ou d'une activation.

Variante propre au sang du cordon ou enzyme normale : les études immunologiques et la chromatographie pratiquées sur une population homogène d'âge devraient aider à résoudre ce problème.

CHAPITRE IV - ETUDE BIOCHIMIQUE DE QUELQUES DEFICITS ENZYMATIQUES.

Parmi les trois cents bilans enzymatiques réalisés depuis 1965, nous avons eu l'occasion de mettre en évidence :

- 4 observations de déficit en G-6PD, groupant 12 cas, dont deux déficits chez des européens porteurs d'une anémie hémolytique chronique
- 1 déficit en pyruvate kinase
- 2 déficits en diaphorase NADH-dépendante chez deux soeurs
- 1 déficit partiel et transitoire en galactokinase

Nous rapportons, dans ce chapitre, l'étude des déficits qui présentent un caractère d'originalité, soit par leur faible fréquence, soit par leur aspect nouveau, ou par l'étude particulière que nous avons entreprise.

A. - ANEMIE HEMOLYTIQUE CHRONIQUE PAR DEFICIT EN GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHY-
GENASE CHEZ UN EUROPEEN.

MISE EN EVIDENCE D'UNE VARIANTE NOUVELLE DE L'ENZYME.

Comme il a été énoncé précédemment, le nombre de sujets atteints par un déficit en G-6PD à travers le monde dépasse 100 millions. Aussi, bien que l'Europe ne soit pas une région de très grande dispersion pour la tare hormis les abords du bassin méditerranéen, nous avons déjà pu mettre en évidence douze déficits en G-6PD répartis en quatre familles. Pour deux d'entre-elles, il s'agit de malades d'origine italienne sujets à des crises hémolytiques de caractère provoqué. L'un de ces déficits a d'ailleurs été soupçonné, puis mis en évidence chez un enfant hospitalisé à la suite d'une ingestion abondante de fèves.

Les deux autres familles, dont l'une découverte il y a seulement quelques semaines et en cours d'exploration, sont d'origine française depuis plusieurs générations et les déficits liés à une anémie hémolytique chronique, non sphérocytaire.

Nous savons qu'il s'agit là d'une forme assez exceptionnelle du déficit en G-6PD, puisque seuls cinquante à soixante observations, presque toutes rencontrées chez des sujets de race blanche, ont été rapportées jusqu'alors (22 - 25 - 71 - 82 - 100 - 148 - 171 - 234 - 236 - 263 - 307 - 373 - 394).

Outre leur caractère de rareté, c'est la détermination des propriétés de l'enzyme déficiente qui confère un intérêt exceptionnel à l'étude de ces déficits.

Cette étude réalisée dans quelques cas seulement a révélé une hétérogénéité considérable de la molécule enzymatique, permettant la description

d'une vingtaine de variantes distinctes sur les cinquante à soixante formes diverses connues (15 - 34 - 39 - 41 - 61 - 66 - 132 - 175 - 209 - 280 - 307 - 353 - 388 - 389). Les propriétés de ces variantes sont rassemblées au Tableau 15.

L'étude biochimique du déficit rapporté ici nous a permis de définir une variante nouvelle de l'enzyme.

HISTOIRE CLINIQUE

Agé de quarante ans, PEL... Roger, autant qu'il puisse s'en souvenir a toujours été plus ou moins ictérique. Dès l'âge de un an, il aurait présenté un premier ictère caractérisé, et depuis, il évoque des poussées ictériques alternant avec des rémissions ; il semble que la prise de certains médicaments aggravait l'ictère.

A l'âge de vingt et un ans, des radiographies de la vésicule ont évoqué pour la première fois une lithiase vésiculaire pour laquelle, le malade est opéré en 1966.

La persistance d'un ictère après l'intervention fait entreprendre un bilan hématologique. Ce dernier montre qu'il n'existe pas d'anémie, mais une réticulocytose à 4 % témoigne d'un effort de régénération sanguine.

Les urines sont presque toujours foncées et les conjonctives subictériques. L'existence d'un ictère d'origine hémolytique a été authentifié par l'existence d'une bilirubine indirecte importante. L'examen cytologique des globules rouges ne révèle pas d'anomalie morphologique, la résistance globulaire est normale, la recherche d'une hémoglobine anormale demeure négative. L'hémolyse est bien compensée. Par contre, la mesure d'activité de la G-6PD révèle un déficit profond.

EXPLORATION BIOCHIMIQUE

1. - Méthodes particulières

a) Mesure de l'activité G-6PD des hématies

L'activité G-6PD lors des premières mesures chez le malade et durant l'enquête familiale a été déterminée à l'aide de réactifs prêts à l'emploi (G-6PDH - Test U.V. BOEHRINGER - Valeurs normales : 120 à 240 milli-unités/10⁹ hématies). Les mesures ultérieures sont effectuées et exprimées selon le protocole décrit au chapitre I (Deuxième partie).

b) Mesure de l'activité G-6PD des leucocytes et des plaquettes

L'activité enzymatique des leucocytes et des plaquettes est mesurée sur des lysats de cellules lavées, préalablement isolées par sédimentation différentielle et centrifugation (91 - 300). Les résultats sont exprimés en U.I. / 10^9 éléments.

c) Méthodes d'étude des caractères de la protéine déficiente

Selon les recommandations du Comité de Nomenclature de l'Organisation Mondiale de la Santé (278), l'identification provisoire des variantes de l'enzyme doit reposer au moins sur l'établissement des critères suivants: activité de l'enzyme dans les hémolysats, mobilité électrophorétique, affinité pour le substrat (Km G-6P), taux relatif d'utilisation du 2-déoxy-glucose-6-phosphate, thermo-stabilité. La détermination de la majorité de ces critères nécessite une purification préalable de l'enzyme que nous avons réalisé par passage sur DEAE-cellulose et précipitation par le sulfate d'ammonium (61 - 278).

Les méthodes employées sont identiques à celles signalées lors de l'étude des caractères physico-chimiques de la G-6PD du sang du cordon (Chap. III - Deuxième partie). Tous les résultats obtenus ont été comparés à des témoins adultes normaux, traités dans les mêmes conditions, dont l'un parallèlement au malade.

2. - Résultats

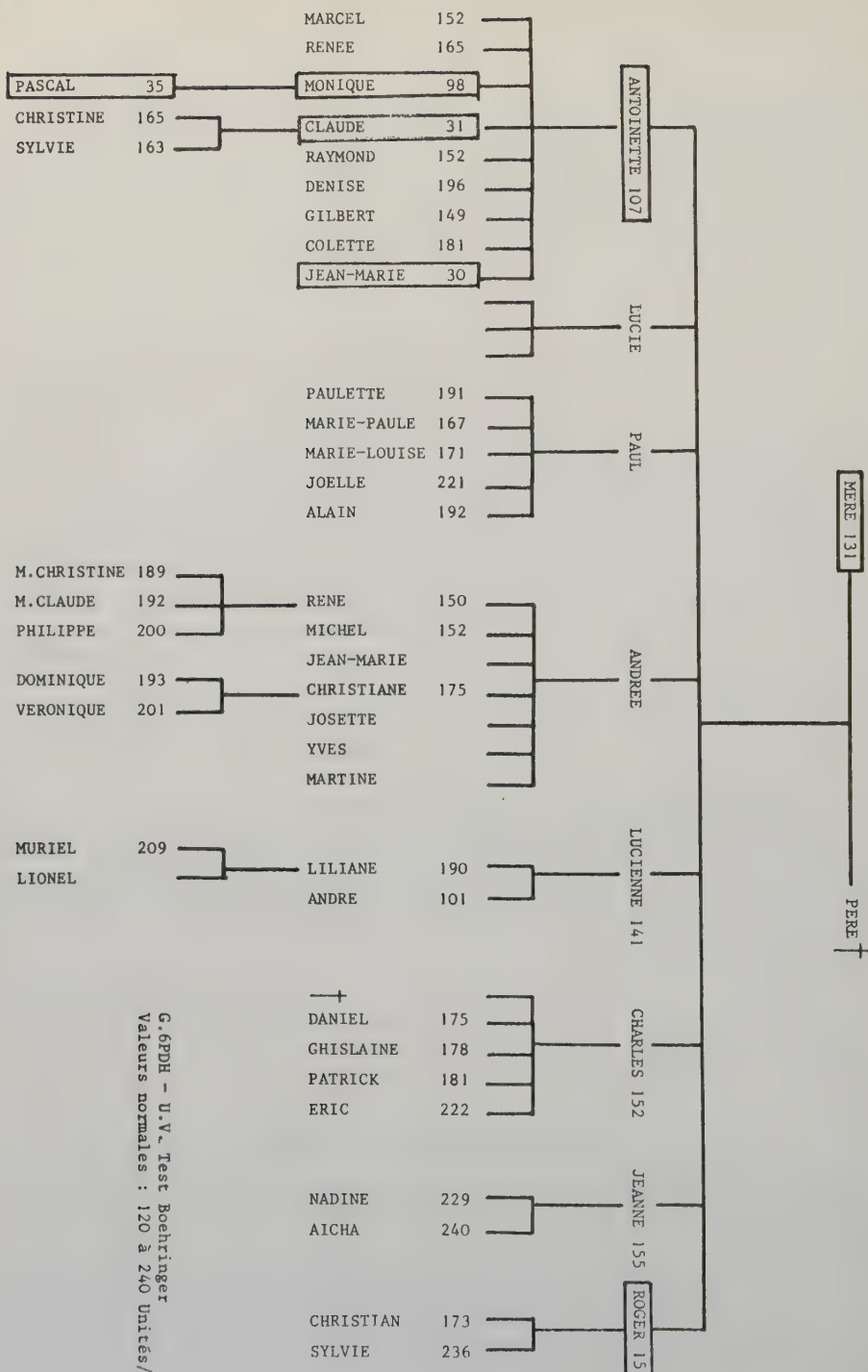
a) Etude familiale

Lors d'une enquête génétique, nous avons pu étudier l'activité de la G-6PD de quarante deux membres de la famille du propositus, ascendants, collatéraux et descendants.

Les résultats de cette enquête familiale sont rapportés à la figure 15.

FIGURE 15 :

FAMILLE PEL...



En plus du malade, cette étude a permis de mettre en évidence six porteurs du déficit répartis ainsi :

- trois femmes : la mère, une soeur et une nièce du malade ;
- trois hommes : tous descendants de la soeur du malade, transmettrice de la tare.

Les deux enfants du malade, un garçon et une fille sont indemnes, ainsi que tous les autres membres pour lesquels le dépistage a pu être entrepris.

Bien que cela ne soit plus à démontrer, il est clair que la transmission du déficit telle qu'elle apparaît sur l'arbre généalogique de la famille (fig. 15) correspond parfaitement à celle d'une tare liée au chromosome X.

b) Etude du propositus

α - Mise en évidence et conséquences biochimiques du déficit (Tableau 13)

Les examens de laboratoire effectués chez le malade à plusieurs reprises, depuis quatre ans, montrent avec une continuité remarquable l'existence d'un ictère d'origine hémolytique (augmentation importante de la bilirubine indirecte) sans anémie.

La durée de vie des hématies par la méthode au chrome radioactif donne une durée de vie de 14 jours $\frac{1}{2}$ donc très diminuée; la durée de vie normale étant égale à 28 jours par la méthode employée.

La présence constante d'une légère réticulocytose correspond à l'effort de régénération fourni par la moelle osseuse.

En dehors de la G-6PD dont le taux d'activité est effondré, - ce qui est confirmé par une stabilité très diminuée du glutathion réduit - les autres activités enzymatiques sont normales.

	23. 7.66	26. 9.66	20.12.66	30. 5.68	12.12.69	Valeurs normales
Hématies ($10^6/\text{mm}^3$)	4,59	5,22	4,62	4,62	4,30	
Réticulocytes %	4	7,5		2,5	2,8	< 2
Bilirubine dir.(mg/l)	4,5	3,5		5	7,3	0
Bilirubine ind.(mg/l)	29,5	51		32	31,2	< 10
Glutathion mg/100 ml				39,4	68,4	80 $\pm$ 20
Test de stabilité du glutathion %				12	9	80 $\pm$ 20
G.6PD	16 (.)	18 (.)	14 (.)	0,14(x)	0,19(x)	1,96 $\pm$ 0,48
6.PGD					1,21(x)	1,31 $\pm$ 0,23
Glutathion réductase				1,30	1,02(x)	1,05 $\pm$ 0,25

(.) G.6PDH - U.V. Test Boehringer - Valeurs normales : 120 à 240 m Unités/

(x) U.I. / ml G.R. à 25°C

TABLEAU 13 : Etude biochimique de PEL... Roger

β - Activité de la G-6PD des leucocytes et des plaquettes

L'activité de l'enzyme leucocytaire ($6,99 \text{ U.I./10}^9$ leucocytes) et celle de l'enzyme plaquettaire ($0,098 \text{ U.I./10}^9$ plaquettes) sont également très abaissées, respectivement à 37 % et 5,4 % des valeurs normales.

Ces valeurs s'accordent assez bien avec les chiffres rapportés par BOERY, HIRSCH et DE GRUCHY (52) qui, pour une activité nulle de la G-6PD érythrocytaire, trouvent pour l'enzyme plaquettaire une activité allant de 16 à 26 %.

Des études semblables entreprises par quelques auteurs (52 - 68 - 69) ont permis de démontrer que si le déficit en G-6PD du sujet noir se trouve confiné aux globules rouges, celui du sujet blanc atteint les autres éléments figurés et s'étend vraisemblablement à tous les tissus.

Ainsi, le déficit en G-6PD se trouve en contradiction avec le déficit en pyruvate kinase, pour lequel le contrôle génétique des enzymes des différents éléments figurés paraît séparé.

γ - Etude des propriétés de l'enzyme déficiente (Fig. 16)

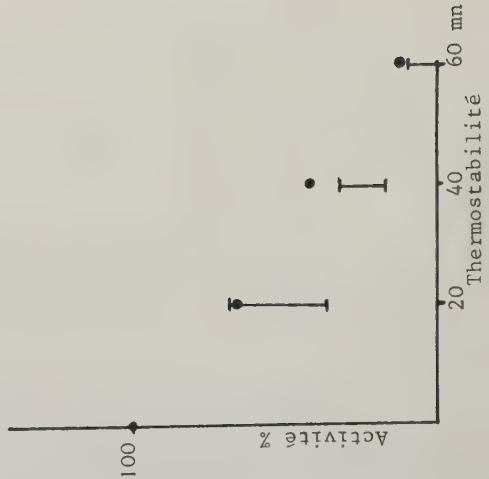
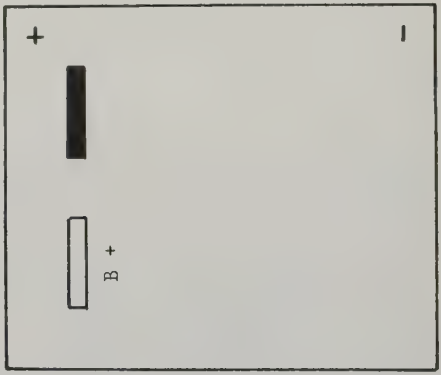
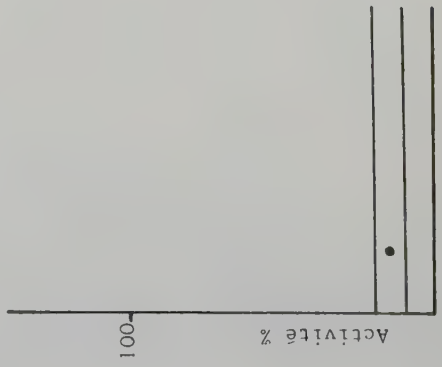
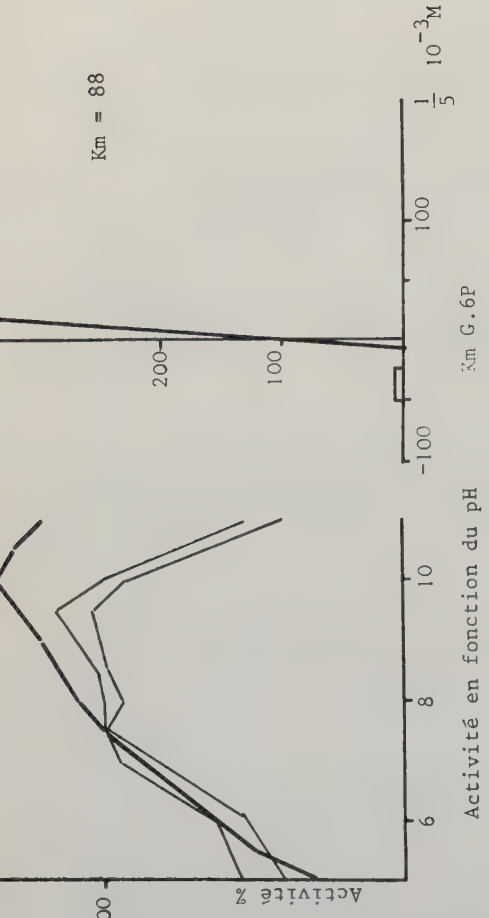
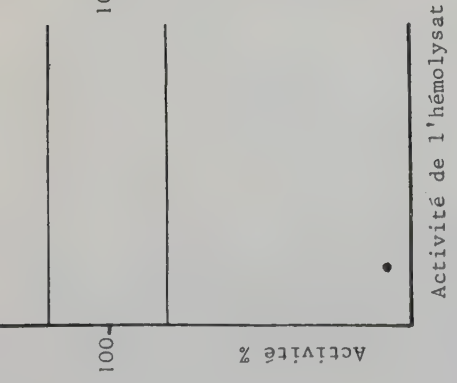
. Activité

Rapportée à la valeur moyenne adulte, l'activité de l'enzyme dans l'hémolysat, mesurée à cinq reprises en l'espace de quatre années est trouvée remarquablement constante, se situant entre 7 et 9 %. Il s'agit d'un déficit très important en accord avec les valeurs habituellement retrouvées dans les déficits du sujet blanc liés à une anémie hémolytique chronique.

. Affinité pour le glucose-6-phosphate (Km G-6P)

Déterminée à partir de la préparation purifiée de l'enzyme, la constante de MICHAELIS est trouvée très augmentée à $88 \mu\text{M}$ G-6P (valeurs normales du laboratoire : $39 \pm 7 \mu\text{M}$).

Km = 88



. Activité vis-à-vis des analogues structuraux du substrat

L' affinité de l'enzyme pour le 2-deoxy-glucose-6-phosphate est légèrement supérieure à celle des témoins ; elle est normale vis-à-vis du galactose-6-phosphate.

Il n'en est pas de même pour le glucose, pour lequel l'enzyme possède une affinité nettement supérieure à la normale. Cette anomalie doit pourtant être accueillie avec réserve, car à l'inverse des autres paramètres, elle n'a pas été retrouvée nettement chez le petit neveu du malade.

. Stabilité de l'activité enzymatique

La stabilité de l'enzyme à la chaleur et au stockage est strictement normale ; ceci est particulièrement important à noter, car la thermolabilité est une caractéristique habituelle des variantes de la G-6PD associées à une anémie hémolytique chronique. Seule jusqu'alors, la variante "FRIBOURG" a été trouvée normalement stable.

. Activité en fonction du pH

Elle est perturbée. L'allure de la courbe se distingue de la courbe normale d'aspect biphasique et ne montre qu'un seul pic d'activité maxima situé à pH 10. Ce caractère la distingue nettement de la majorité des variantes déjà décrites.

. Mobilité électrophorétique

L'enzyme migre comme l'enzyme B (+) normal.

c) Etude du petit neveu du propositus

LIT... Pascal, petit neveu de Roger, actuellement âgé de sept ans, est également atteint par le déficit en G-6PD (0,22 U.I./ml GR).

Les résultats des examens pratiqués sur l'enfant et les propriétés de l'enzyme purifiée figurent au tableau 14.

	PEL...Roger	LIT... Pascal	Témoin
Hématocrite	440	420	
Hématies ($10^6/\text{mm}^3$)	4,3	4,41	
Réticulocytes %	2,8	3,7	< 2
Bilirubine dir. (mg/l)	7,3	6,5	0
Bilirubine ind. (mg/l)	31,2	1,13	< 10
Activité de la G.6PD par ml/GR	0,19	0,22	$1,96 \pm 0,48$
pour 10^9 leucocytes	6,99	4,4	18,6
pour 10^9 plaquettes	0,098	0,052	0,180
Etude de la G.6PD éry- throcytaire			
Km G.6P μM	88	88	39 ± 7
Mobilité électrophoré- tique	B (+)	B (+)	B (+)

TABLEAU 14 : Etude biochimique comparative des déficits
en G.6PD de PEL... Roger et LIT... Pascal

Il est intéressant de noter, bien que cela était prévisible, l'identité assez remarquable des résultats obtenus chez deux malades d'une même famille assez éloignés l'un de l'autre. Cette concordance démontre la transmission de la mutation sans altération de ses propriétés.

DISCUSSION

La preuve d'un déficit en G-6PD associé à une anémie hémolytique chronique a été faite.

Bien que cela soit intéressant de par la rareté des cas rapportés, la véritable question à résoudre résidait dans la nature de la molécule enzymatique responsable du déficit.

Pour cela, nous avons comparé les propriétés de l'enzyme isolée à celle des variantes déjà décrites (Tableau 15).

A ce sujet, il faut noter que la comparaison des différentes variantes entre-elles est parfois délicate car quelques unes n'ont été décrites que de façon très sommaire, ce qui rend leur originalité incertaine (Variantes BERLIN, TUBINGEN, EYSEN, ...).

Il est aussi probable que des variantes décrites sous des noms différents sont en réalité voisines ou même identiques compte-tenu des variations des résultats qui interviennent d'un laboratoire à l'autre. Mais cet écueil se trouve tout de même considérablement réduit par la mise en oeuvre des techniques recommandées par la Commission de Nomenclature de l'Organisation Mondiale de la Santé (278).

La protéine enzymatique que nous avons isolée et partiellement purifiée se distingue :

- par son activité des variantes FRIBOURG d'activité supérieure, des va-

Variante	Race	Activité %	Mobilité électrophorétique	Km G6P (μ moles G6P)	Km NADP (μ moles NADP)	2-deoxyglucose-6- phosphate %	galactose-6- phosphate %	stabilité (normale = +++)	activité en fonction du pH
A	Noire	100	N	N	N	N	N	+++	N
B	Blanche	100	N	N	N	N	N	+++	N
Albuquerque	Blanche	1	N	115	11	0		+	N
Alhambra	Blanche	10-25	-	55	2,6	2		++	N
Ashod	Blanche	5	-	100		+		++	6,5 et 10
Bat-Yam	Blanche	0	N	27		40		+	6,5 et 10
Bangkok	Blanche	5	N	60	5,3	+		+	8,5
Beaujon	Blanche	0	+	182					9,5
Berlin	Blanche	0,1		++		0			
Chicago	Blanche	9 -26	N	58-76	3,1 3,7	N		+	N
Clichy	Blanche	2,5	N	178				9,5	
Duarte	Blanche	8,5	N	N	N	+		+	7
Eysen	Blanche	0	+					+	
Freiburg	Blanche	50		N	N			N	7,5
Lifta	Blanche	0	-	25		60		+	sans max.
Milwaukee	Portoricaine	1	-	224		N			8
Ohio	Blanche	2 -16	+	+	+	N		+	
Oklahoma	Blanche	4 -10	N	127 200	20	N		++	Pic émit
Paris	Blanche	0 -10		280				+	7,5 9,5
Ramat-Gan	Blanche	0	-	35		40		+	6,5 10,5
Strasbourg	Blanche	6	N	96	13			++	9
Tübingen	Blanche	0,3	N	-	-				
"Nancy"	Blanche	7-9	N	88		5,5	N	N	10

Tableau 15 : Tableau des variantes de la G.6PD associées à une maladie hémolytique congénitale non sphérocytaire

riantes ALBUQUERQUE, BAT-YAM, BEAUJON, CLICHY, EYSEN, LIFTA, RAMAT-GAN et TUBINGEN d'activité à peu près nulle.

- . par sa mobilité électrophorétique des variantes ALHAMBRA, ASHDOD, LIFTA, MILWAUKEE, RAMAT-GAN de mobilité inférieure à la normale, et des variantes BEAUJON, CLICHY, EYSEN et OHIO de mobilité augmentée.

- . par sa constante de Michaelis vis-à-vis du glucose-6-phosphate (Km G-6P) des variantes israéliennes BAT-YAM, LIFTA et RAMATGAN dont la Km G-6P est diminuée, des variantes BEAUJON, CLICHY, MILWAUKEE, OKLAHOMA, PARIS, pour lesquelles la Km G-6P est très augmentée. Sa Km G-6P augmentée par rapport à la normale la différencie également des variantes DUARTE et FRIBOURG qui sont normales.

- . par son affinité, pour le 2-deoxy-glucose-6-phosphate des quatre variantes israéliennes ASHDOD, BAT-YAM, LIFTA, RAMAT-GAN et de la variante BANGKOK.

- . par sa stabilité de toutes les variantes à l'exception de la variante FRIBOURG.

- . par son activité en fonction du pH de toutes les variantes, mais particulièrement de celles possédant une courbe biphasique à deux maximum d'activité.

Il ressort de cette étude comparative que l'enzyme isolée, agent causal d'un déficit en G-6PD associé à une anémie hémolytique chronique, possède des propriétés originales encore jamais rapportées dans la littérature à notre connaissance.

Les différences observées sont telles que l'autonomie de la variante peut être considérée comme pratiquement certaine d'autant plus qu'elle est retrouvée identique chez deux malades d'une même famille à des époques différentes.

Selon la recommandation du Comité de Nomenclature de l'Organisation

Mondiale de la Santé, nous proposons de la désigner comme Gd (-) "Nancy" du nom de la ville où elle a été mise en évidence.

Pour les critères d'identification demandés, elle se définit comme suit :

Variante Gd (-) NANCY

Activité de l'hémolysat : 7 à 9 %

Constante de Michaelis pour le G-6P (K_m G-6P) : 88 μM

Migration électrophorétique : normale B (+)

Taux relatif d'utilisation du 2-deoxy-glucose-6-phosphate : 5,5%

Thermostabilité: normale

La description d'une nouvelle variante, alors qu'il en existe déjà une vingtaine et qu'il est évident que le nombre de types anormaux de G-6PD va aller croissant, nécessite quelques commentaires :

1 - Jusqu'à ce jour, il n'a pas été possible de mettre en évidence une quelconque corrélation entre les propriétés des diverses variantes et la sévérité de la maladie hémolytique qui en découle.

2 - L'observation des propriétés des variantes décrites montre qu'il est possible de les classer grossièrement en deux types :

- celles qui ont une faible affinité pour le glucose-6-phosphate manifestée par une K_m G-6P élevée. Elles se nomment ALBUQUERQUE (39), ASHDOD (307), BEAUJON (61), CLICHY (61), MILWAUKEE (278), OHIO (278), OKLAHOMA (209), PARIS (61), STRASBOURG (388) et NANCY.

- celles qui présentent une labilité très marquée in vitro. Ce sont les variantes ALBUQUERQUE (39), BAT-YAM (307), BANGKOK (278), CHICAGO (278), DUARTE (39), EYSEN (278), LIFTA (307), OHIO (278), PARIS (61), RAMAT-GAN (307).

3 - Il n'est pas exclu que l'enzyme trouvée soit, dans certains cas, une isoenzyme physiologique, normalement présente à l'état de traces et augmentée du fait de l'absence de l'enzyme principale. On trouverait ainsi une certaine analogie avec les élévations compensatrices de l'hémoglobine A₂ et de l'hémoglobine F dans les β -thalassémies.

4 - En définitive, seule une analyse précise des chaînes polypeptidiques des diverses molécules permettra une nomenclature valable des enzymes pathologiques. Malheureusement, la G-6PD représente moins d'1/20.000 ème des protéines totales de l'érythrocyte humain et avec les moyens techniques actuellement à notre disposition, elle n'est obtenue à la pureté nécessaire aux études séquentielles qu'en traitant longuement de très grandes quantités de sang. (403).

Force est donc de se contenter pour l'heure d'un certain nombre de caractéristiques fonctionnelles relativement simples qui, par chance, donnent une plus grande variété de moyens pour effectuer la détermination phénotypique que ce n'est le cas avec des protéines telles que les hémoglobines.

B. - METHEMOGLOBINEMIE CONGENITALE PAR DEFICIT EN DIAPHORASE NADH-DEPENDAN-
TE CHEZ DEUX SOEURS.

Les observations de méthémoglobininémie congénitale par déficit en diaphorase sont assez rares et les travaux récents ont permis de soupçonner l'existence de plusieurs variétés de cette enzymopathie (101 - 167 - 221 - 268 - 288 - 377).

Ces raisons justifient la présentation des observations de deux soeurs méthémoglobininémiques que nous avons étudiées.

HISTOIRE CLINIQUE

Observation n° 1

WIND.. Martine est hospitalisée le 3 juin 1967 au Service de Pédiatrie du C.H.U. avec le diagnostic de cardiopathie congénitale cyanogène.

Née au terme d'une grossesse normale, elle présente dès les premières semaines de la vie une cyanose des lèvres et des extrémités, s'accroissant lors des cris et des tétées, et par temps froid et humide.

A l'examen, cette enfant hypotrophique rachitique, est affligée d'une cyanose intense, généralisée, prédominant au niveau des lèvres et des extrémités et associée à une dyspnée avec polypnée, s'exagérant au moindre effort.

Le diagnostic de méthémoglobininémie est envisagé. Le dosage de la méthémoglobine quelques heures après l'entrée, donne un taux de 70 %.

L'enfant est soumise à une oxygénothérapie intensive qui améliore rapidement son état : la méthémoglobine chute à 20 % en 24 heures pour se stabiliser entre 15 et 10 % les jours suivants.

Un examen plus approfondi met en évidence un important retard psychomoteur.

L'enfant sort du service après un mois, avec un traitement par vitamine C, administré per os. La méthémoglobininémie est de 12 %.

Observation n° 2

WIND... Suzanne naît quinze jours après la sortie de l'hôpital de sa sœur Martine. L'existence d'une cyanose est notée rapidement, mais son hospitalisation n'est décidée qu'à l'âge de dix-huit jours.

La méthémoglobininémie est à 37 %. L'examen neurologique est normal, ainsi que l'examen cardio-vasculaire et pulmonaire.

A la sortie de l'hôpital, la cyanose est discrète, limitée aux extrémités, la méthémoglobininémie à 9 %.

EXPLORATION BIOCHIMIQUE

1 - Méthodes particulières

- Electrophorèse de l'hémoglobine en gel d'amidon à pH 8,9
- Recherche d'une hémoglobine M par spectrophotométrie en tampon phosphate à pH 6,8
- Dosage de la méthémoglobine selon la technique d'EVELYN et MALLOY
- Mesure de la diaphorase-NADH dépendante selon SCOTT (347)
- Mobilité électrophorétique des diaphorases en gel d'amidon à pH 9,3 (196).

2 - Résultats (Tableau 16)

Nous avons pu étudier le père, la mère, le frère et les deux sœurs des malades ; l'étude des groupes sanguins développés a permis d'affirmer la réalité de la paternité pour les cinq enfants.

- Méthémoglobininémie

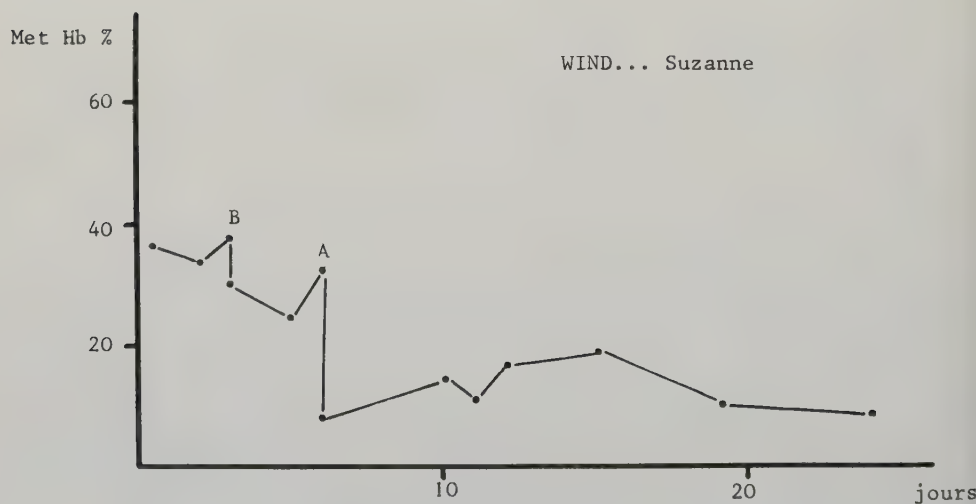
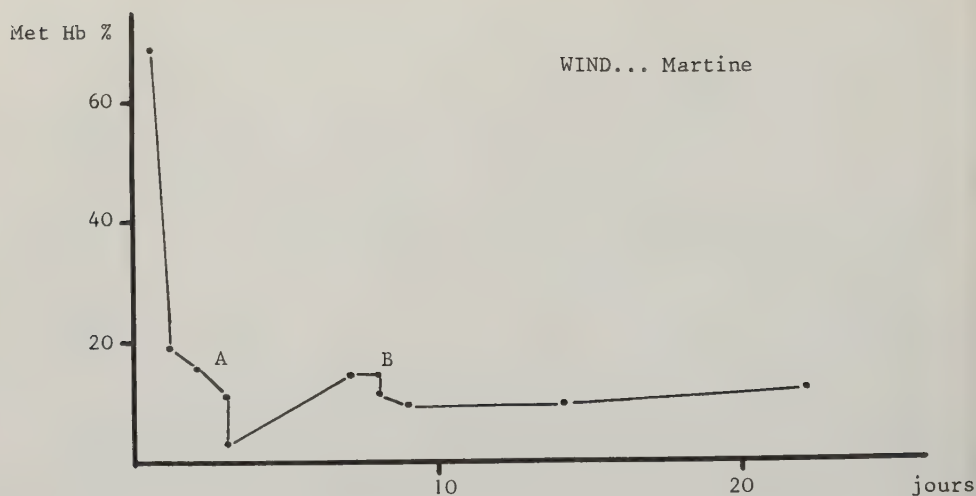
Les variations de la méthémoglobininémie au cours de l'hospitalisation chez les deux malades (Figure 17) s'étalent de 70 à 12 % pour Martine et de 37 à 9 % pour Suzanne.

Chez les parents, le frère et les sœurs des malades, les taux de méthémoglobine déterminés deux fois à 30 jours d'intervalle sont souvent trouvés anormalement élevés par rapport aux témoins.

	GEORGES (père)	MONIQUE (mère)	CHANTAL	ISABELLE	GEORGES	MARTINE	SUZANNE	VALEURS NORMALES
Electrophorèse de l'hémoglobine	N	N	N	N	N	N	N	N
Recherche d'hémoglobine M	0	0	0	0	0	0	0	0
Méthémoglobine %	1,5 4,4	2,5 7,9	3,4 3,3	2,2 2,8	4,5 4,6	de 70 à 12	de 37 à 9	< 3
Activité diaphorase NADH $\times 10^{-4}$	91 78	85 32	65	145	65	25 10 00	15 07 02	> 30
Electrophorèse diaphor. NADH(mm)	29	29(°)				absence		29
Electrophorèse Diaphor. NADPH (mm)	26	26(°)				absence		26

(°) bande de faible intensité

TABEAU 16 : Etude biochimique de la famille WIND...



A = test au bleu de méthylène
 B = test à la vitamine C

Figure 17 : Evolution de la méthémoglobinémie

- Diaphorase NADH-dépendante

Chez les deux malades, les activités de la diaphorase NADH-dépendante se situent lors de la première mesure dans la zone définie par SCOTT (347) comme étant celle des hétérozygotes (0,0010 à 0,0030) et lors de la deuxième, puis de la troisième détermination (réalisée plus d'un an après la première) dans celle des malades homozygotes (activité inférieure à 0,0010).

Cependant, les taux d'activité chez les autres enfants et surtout chez les parents sont ceux d'homozygotes normaux.

Notons toutefois qu'une activité juste normale (0,0032) correspond chez la mère à une méthémoglobinémie de 7,9 %.

- Mobilité électrophorétique des diaphorases

Nous avons appliqué la technique décrite par KAPLAN et BEUTLER (196) ; le matériel soumis à l'électrophorèse a consisté en hémolysats au demi.

Pratiquée en même temps chez les parents, les deux malades (un an environ après leur hospitalisation), et deux témoins, la révélation des deux diaphorases sur deux gels différents n'a pas montré d'anomalie de mobilité chez les parents, mais il faut souligner que l'intensité des bandes révélées chez la mère était très nettement inférieure à celle des témoins. Cet examen correspondait chez elle à une activité de la diaphorase NADH de 0,0032.

L'activité diaphorasiqye totalement effondrée des deux enfants (0,0000 et 0,0002) lors de l'examen n'a pas permis la mise en évidence de quelque bande que ce soit. Une situation identique, d'ailleurs logique, a déjà été signalée par KAPLAN ; mais il est tout de même curieux de constater que la diaphorase NADPH n'est pas non plus mise en évidence alors que le traitement par le bleu de méthylène en injection intra-veineuse a montré qu'elle était activable.

DISCUSSION

Les résultats de l'étude familiale appellent certains commentaires.

Signalons tout d'abord deux points qui nous intéressent peu ici.

Une première particularité est le taux initial très élevé de la méthémoglobininémie chez Martine, contrastant avec les troubles fonctionnels relativement modérés relevés par les cliniciens (167).

Le deuxième point est la constatation chez la mère, le frère et Chantal, de taux de méthémoglobine élevée, alors que l'activité de leur diaphorase est normale ; ceci nous a conduit à évoquer la possibilité d'une intoxication familiale par substance méthémoglobinisante. La preuve d'une telle intoxication n'a pu être faite ; l'étude de l'eau de boisson n'a pu mettre en évidence la présence de nitrites ou de nitrates en quantité anormale. Notons qu'ANGELOUPOLOS (6) signale également avoir trouvé chez la mère de deux malades, une méthémoglobininémie élevée alors que l'activité de la diaphorase n'était que discrètement abaissée.

Du point de vue biochimique, une notion plus intéressante réside dans les taux d'activité de la diaphorase trouvés chez les parents, le frère et les soeurs des malades. Ce sont des taux de sujets normaux en contradiction avec ceux enregistrés chez les sujets porteurs de la tare par la majorité des auteurs, en particulier par SCOTT (348).

D'autre part, le retard psycho-moteur marqué de Martine, attirait également notre attention ; on sait en effet que l'étiologie de la débilité mentale constatée dans un certain nombre de méthémoglobininémies congénitales par déficience enzymatique est discutée : secondaire pour certains à l'anoxie chronique due à la méthémoglobininémie, elle serait pour d'autres la marque d'une forme génétique particulière.

Ce sont ces faits, associés à la description récente, signalée an-

térieurement, de bande de mobilité anormale (113 - 196 - 398) qui nous ont conduits à envisager la mesure de la mobilité électrophorétique de la diaphorase.

En effet, WEST et Coll. (398) ont pu mettre en évidence, chez la mère d'un malade, par électrophorèse en gel d'amidon, la coexistence d'une fraction normale et d'une bande anormale, cette dernière ayant une migration similaire à celle du malade.

De leur côté, KAPLAN et BEUTLER (196) ont démontré, dans un déficit, l'existence d'une forme particulière, caractérisée par une activité diminuée de 70 % chez l'homozygote et une mobilité électrophorétique anormale, qu'ils nomment variante "Californie".

Nous pouvions donc raisonnablement espérer un éclaircissement des contradictions observées chez nos malades par l'étude de la mobilité électrophorétique. Or, aucune anomalie qualitative n'a pu être décelée chez les parents et les activités voisines de zéro des deux malades n'ont pas permis la révélation de l'électrophorèse.

Que conclure ?

Sur le plan génétique, bien que la démonstration d'un défaut d'activité n'ait pas pu être mis en évidence chez les parents, sauf à l'électrophorèse chez la mère, une hérédité autosomique récessive, telle qu'elle est presque toujours retrouvée dans cette affection paraît probable.

Mais, si une relation est supposée entre débilité et activité diminuée de la diaphorase, elle ne semble pas due dans notre cas à l'existence d'une forme moléculaire anormale de l'enzyme révélabable par électrophorèse.

C. - DEFICIT PARTIEL ET TRANSITOIRE EN GALACTOKINASE ERYTHROCYTAIRE CHEZ

UN NOUVEAU-NE.

Depuis la découverte du déficit par GITZELMANN en 1965 (151), seuls cinq cas répartis dans trois familles, et tous dus au même auteur, ont été décrits dans la littérature.

La place particulière occupée par la galactokinase dans le métabolisme du galactose associée à la large variation physiologique de son activité au cours des premiers mois de la vie, imposait l'étude évolutive d'un tel déficit chez un nouveau-né.

Le déficit décrit ici est à rapprocher de l'observation néo-natale rapportée par TALHAMMER et GITZELMANN en 1968 (375) ; il s'en distingue par son caractère partiel et transitoire, une particularité qui, à notre connaissance, n'a encore jamais été retrouvée dans cette érythroenzymopathie.

HISTOIRE CLINIQUE

MA... Sylvain est le cinquième enfant de parents d'origine italienne, non consanguins. Au cours de la grossesse, la mère souffre de néphropathie, et l'enfant naît prématurément à 8 mois 3/4 pesant seulement 1.830 g.

Un ictère d'intensité modérée apparaît le deuxième jour. La surveillance de vomissements au quatrième jour de la vie, après 72 heures d'alimentation lactée, et la présence de corps réducteurs, autres que du glucose dans les urines, font suspecter la possibilité d'une galactosémie congénitale, diagnostic infirmé par un taux d'activité normal de la galactose-1-phosphate-uridyltransférase érythrocytaire. Cependant, l'étude de la galactokinase érythrocytaire montre un net déficit par rapport à son taux normal d'activité chez les témoins normaux du même âge.

L'examen clinique ne montre pas d'hépatomégalie. L'examen ophtalmologique ne révèle pas d'opacités cristalliniennes.

L'enfant a été soumis à un régime sans galactose, jusqu'à l'âge de 7 mois ; il est actuellement suivi depuis 20 mois, son développement psychomoteur et statupondéral est normal ; il n'existe aucune atteinte cristallinienne ni hépatique.

Le père, la mère, le frère, et les trois soeurs du malade ont pu être étudiés. Leur examen clinique est normal ; l'examen à la lampe à fente

ne montre pas d'altération cristallinienne.

EXPLORATION BIOCHIMIQUE

1 - Méthodes particulières

La voie métabolique du galactose a été explorée aussi complètement que possible : mesure des activités enzymatiques, détermination des substrats, dosage du galactose consommé in vitro, épreuves de charges.

Activités enzymatiques

Galactose-1-phosphate uridylyltransférase, déterminée selon la technique de KALCKAR modifiée par BRETTHAUER (76).

UDP galactose-4-épimérase (E.C. 5.1.3.2.) mesurée par la méthode indirecte proposée par MAXWELL (103 - 256).

UDPG pyrophosphorylase (E.C. 2.7.7.9.) mesurée selon KALCKAR (5).

Galactose-1-phosphate

Il est mesuré selon la méthode enzymatique de KIRKMAN et MAXWELL (208).

Epreuves de charges

- Lors des épreuves de charge réalisées per os ou par voie intraveineuse, le glucose et le galactose sanguins sont spécifiquement dosés par la glucose oxydase et la galactose déshydrogénase en microméthode.

- Les urines sont recueillies sur la glace par fractions de six heures durant 48 heures après la charge de galactose.

- Les sucres urinaires sont mis en évidence par chromatographie sur couche mince de gel de silice imprégné d'acide borique.

- La recherche du galactitol est conduite par chromatographie en phase gazeuse des dérivés triméthylsilylés (19 - 397) sur colonne SE 30 10 % sur Aéropak (chromatographe GIRDEL, GIRAVIONS-DORAND) à 175°C après isolement préalable à partir de l'urine : destruction de l'urée par l'uréase, déprotéinisation par défécation tungstique, désionisation par passage sur résine échangeuse d'ions, concentration par lyophilisation et reprise du résidu par la pyridine avant silylation.

2 - Résultats

a) Etude du propositus (Tableau 17)

α - Activités enzymatiques

GALACTOKINASE

. L'activité de la galactokinase de MA... Sylvain a été mesurée à 13 reprises durant 7 mois, à jeun et au cours des épreuves de charge en galactose. Jusqu'à l'âge de 3 mois, elle s'est toujours révélée très faible comparée à celle des témoins du même âge et des témoins adultes. Pour cette période, la moyenne de l'activité enzymatique est de 0,109 U.I./ml G.R.

Des déterminations successives de l'activité de la galactokinase ont montré à partir de 5 mois une élévation progressive de l'activité qui devient normale à l'âge de 7 mois (450 U.I./ml G.R.).

Des mesures par voie isotopique réalisées parallèlement grâce à l'obligeance de M. GITZELMANN, ont donné des résultats concordants (154).

Mesurée à 20 mois, elle est de 0,350 U.I./ml G.R.

. Pour éliminer une éventuelle intervention des réticulocytes, peu probable comme nous l'avons démontré, ils ont été évalués à chaque prélèvement chez le malade, la réticulocytose maximum trouvée étant de 1,6 %.

. L'éventualité d'un inhibiteur de l'enzyme a été éliminée à deux reprises, en mesurant l'activité enzymatique d'un mélange à parties égales

		GALACTOKINASE U.I./ml G.R.	ACTIVITE GALACTOLYTIQUE μ M/ml G.R./H
Témoins enfants (0 à 8 mois)		voir Figure	0,670 à 1,088
SYLVAIN	3 semaines	0,094	0,205
	4 semaines	0,124	0,322
	5 semaines	0,119	
	6 semaines	0,168	
	7 semaines	0,065	
	8 semaines	0,162	
	8 semaines	0,124	
	9 semaines	0,068	
	10 semaines	0,162	0,250
	11 semaines	0,176	
	14 semaines	0,169	
	18 semaines	0,206	
	28 semaines	0,450	0,594
Témoins adultes		0,219 $\pm$ 0,042	0,166 à 0,305
PERE		0,248	0,250
MERE		0,170 0,155 0,172 0,232	0,166
SYLVIO (16 ans)		0,217	0,205
SIMONE (10 ans)		0,305	0,250
ANNA (8 ans)		0,245	0,322
MARIE (6 ans)		0,277	0,294

TABLEAU 17 : Etude biochimique de la famille MA...

d'un hémolysat témoin adulte et de l'hémolysat de l'enfant.

. Des essais de conservation de l'hémolysat du malade (24 heures à + 4°C) ont montré une diminution d'activité parallèle à celle des témoins enfants et adultes.

. Le comportement de l'enzyme vis-à-vis du L-Fucose est également semblable à celui des témoins.

AUTRES ACTIVITES ENZYMATIQUES

Les activités de la galactose-1-phosphate uridylyltransférase, de l'épimérase et de l'UDP pyrophosphorylase sont normales. Les enzymes glycolytiques déterminés à l'âge de deux mois, alors que l'activité de la galactokinase était très diminuée, présentent toutes une activité normale. Ceci est également le cas de la phosphoglucomutase qui serait inhibée par l'accumulation du galactose-1-phosphate.

β - Consommation du galactose in vitro

La consommation du galactose in vitro, variable avec l'âge, a été mesurée à quatre reprises chez Sylvain. Elle a été trouvée très diminuée jusqu'à l'âge de 3 mois environ, tandis qu'une nouvelle détermination à l'âge de 6 mois, montre une consommation à la limite inférieure de la normale. Ceci témoigne indirectement de la normalisation progressive de l'activité enzymatique puisque nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un certain parallélisme entre l'utilisation du galactose par les hématies in vitro et l'intensité de l'activité de la galactokinase.

γ - Galactose-1-phosphate

Le taux du galactose-1-phosphate a toujours été normal chez notre malade, alors qu'il aurait pu être trouvé diminué, mais la technique employée pour son dosage, habituellement destinée à démontrer une accumulation de galactose-1-phosphate (208), manque de sensibilité dans les valeurs

faibles pour mettre en évidence une diminution légère (344).

δ - Epreuves de charge en galactose (118 - 230 - 312)

L'étude en a été faite à trois reprises aux âges de 2 mois 1/2 et 3 mois. Deux charges ont été effectuées par voie orale à la dose de 1,75 g/kg: une charge a été faite par voie intra-veineuse à la dose de 1 g/kg.

Au cours de ces épreuves, réalisées simultanément chez le malade et chez un témoin de même âge et de même poids, la galactosémie, la glucosémie, l'excrétion urinaire du galactose, du glucose, du galactitol ont été étudiées.

Les résultats obtenus ne montrent pas de différences significatives entre les taux de galactosémie et de glucosémie du malade et des témoins. Au cours de l'épreuve de charge par voie intra-veineuse, le coefficient de disparition du galactose est de 5,3 chez le malade (5,7 chez le témoin).

Par contre, l'étude de l'excrétion urinaire de galactitol montre que celle-ci se poursuit 48 heures après la charge chez le malade, alors que son alimentation avant et après la charge est dépourvue de galactose. Chez les témoins au contraire recevant avant et après la charge, un régime lacté normal, le galactitol disparaît plus rapidement.

b) Etude de la famille (Tableau 17)

L'étude biochimique a pu être réalisée chez les parents, le frère et les trois soeurs du malade. Les tests de charge n'ont pu être étudiés et nous n'avons pu examiner les autres membres de la famille en particulier maternelle.

α - Galactokinase

Les taux d'activité de la galactokinase sont normaux chez le père et les quatre enfants.

Il n'en est peut être pas ainsi chez la mère pour laquelle l'acti-

vité de l'enzyme mesurée quatre fois à un mois d'intervalle a été trouvée à trois reprises légèrement inférieure (0,170 - 0,155 - 0,172 U.I./ml G.R.) à la limite extrême de nos valeurs normales (0,177 U.I./ml G.R.) et une fois normale.

β - Consommation du galactose in vitro

Tout à fait normale chez le père et les quatre enfants, elle se situe chez la mère à la limite inférieure des valeurs déterminées chez les témoins normaux.

γ - Sucres urinaires

Dans l'urine du père, du frère et des trois soeurs de l'enfant, la recherche par chromatographie en couche mince et en phase gazeuse du glucose, du galactose et du galactitol, ne révèle pas d'anomalie.

Chez la mère par contre, sans jeûne préalable, l'excrétion de galactose dans les urines est modérément élevée.

DISCUSSION

1 - La preuve d'un déficit partiel en galactokinase érythrocytaire est démontrée par l'activité nettement diminuée de l'enzyme durant les cinq premiers mois de la vie de l'enfant. Elle est confirmée par l'absence d'inhibiteur.

2 - La nature héréditaire du déficit peut paraître vraisemblable en raison de la mise en évidence d'une galactokinase de faible activité chez la mère du malade. Toutefois, si au lieu de considérer l'écart des valeurs normales $m \pm 2 \sigma$, nous calculons l'écart $m \pm 3 \sigma$, égal à $0,219 \pm 0,063$, et correspondant à 99 % des sujets normaux, on constate que l'activité enzymatique de la mère entre dans ces valeurs et peut être considérée comme normale.

3 - Le comportement de l'activité enzymatique, étudié lors de la conservation et vis-à-vis d'un analogue de structure du substrat, plaide en faveur d'une forme moléculaire normale de l'enzyme, mais il est par trop évident que le petit nombre de tests entrepris n'autorise pas à conclure.

4 - Le déficit semble isolé. Les enzymes glycolytiques érythrocytaires, mesurés alors que l'activité de la galactokinase était très diminuée, montrent des taux normaux d'activité.

Les cliniciens n'ont jamais trouvé de signes cliniques ou biologiques d'insuffisance hépatique, mais les travaux de CUATRECASAS et SEGAL (110), qui ont étudié la galactokinase hépatique du rat, observent une relation activité-âge, qui semble identique aux variations observées dans les érythrocytes humains. Malheureusement, nous n'avons pas eu l'occasion d'étudier la galactokinase hépatique du malade.

5 - Le déficit se traduit in vitro par une diminution nette de la consommation du galactose par les hématies ; et bien que le coefficient d'utilisation du galactose paraisse normal chez le malade lors des épreuves de charge, la présence prolongée de galactitol dans l'urine paraît en faveur de l'exaltation d'une voie métabolique secondaire.

6 - Bien que l'atteinte hépatique ne soit pas prouvée, l'existence de cataractes attribuées à la présence de galactitol dans les observations de GITZELMANN (151 - 152 - 153 - 155 - 375), a incité les cliniciens à la prudence en instituant un régime d'exclusion de galactose.

7 - Nous avons assisté à partir de l'âge de 5 mois à une évolution régressive du déficit : il s'agit donc d'un déficit partiel et transitoire de l'activité de la galactokinase, dont à notre connaissance, aucun cas semblable n'est rapporté dans la littérature.

8 - L'évolution de l'activité enzymatique est intervenue lors d'un régime sans galactose, hormis les épreuves de charge, ce qui rend peu probable une induction par le substrat.

CHAPITRE V - ENZYMES ERYTHROCYTAIRES ET ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

André LWOFF a écrit : "l'être vivant est un système hautement complexe, capable de reproduction, c'est-à-dire de multiplier l'ordre biologique spécifique".

L'étude de la transmission des caractères héréditaires a commencé en 1865 avec les travaux de MENDEL.

Les cytologistes connaissent les chromosomes depuis longtemps ; dès 1866, HAECKEL se rendit compte que le noyau qui contient précisément les chromosomes est l'organe cellulaire du maintien et de la transmission des caractères héréditaires - et en 1892, WEISMANN comprenait que ces caractères sont localisés dans les chromosomes.

A partir de 1910, un insecte particulièrement propice à l'observation, la drosophile ou mouche du vinaigre, allait permettre à MORGAN et à ses élèves, au prix d'un travail gigantesque, d'étendre l'analyse de l'hérédité par la génétique.

Le nom de gènes a été donné à des particules portées par les chromosomes, déterminant chacune un caractère spécifique. Une des découvertes fondamentales auxquelles conduisirent les travaux de MORGAN fut la reconnaissance de la solidarité qui liait constamment certains gènes entre eux, et la démonstration qu'elle résultait d'une association à l'échelle morphologique ; on admet que chaque gène occupe sur un chromosome précis un emplacement déterminé qui est son locus, et qu'un caractère donné dépend de deux gènes appariés qui sont dits allèles.

Depuis, les généticiens ont tenté par différents moyens de repérer

la situation des gènes sur les chromosomes dans le but d'établir une topographie chromosomique.

Exception faite du chromosome X pour lequel il existe une ébauche sérieuse de cartographie des gènes (204 - 314), grâce au dimorphisme gonosomique de l'espèce humaine, les cytogénéticiens possèdent peu de renseignements sur le rôle de chacun des autosomes. Pour l'heure, ils associent les aberrations de nombre et de structure à des syndromes cliniques.

L'établissement d'une relation constante entre la mise en évidence d'une anomalie morphologique d'un chromosome donné et la découverte d'une altération de certaines constantes biologiques, devrait être un moyen logique capable de préciser l'emplacement d'un gène sur un chromosome. L'étude des groupes sanguins développés, la détermination quantitative des immunoglobulines, la transmission des types d'haptoglobines, les mesures d'activités enzymatiques comptent ainsi parmi les moyens d'étude d'une carte factorielle.

L'observation d'activités enzymatiques modifiées, décrite par quelques auteurs (258 - 269 - 293 - 345), dans certaines anomalies chromosomiques, nous a incité à mesurer l'activité des enzymes érythrocytaires de malades atteints de différents syndromes.

L'étude de tels individus, particulièrement de ceux qui présentent un chromosome surnuméraire et surtout une délétion, devrait aider à la localisation des gènes structuraux. Cette hypothèse de travail repose sur deux concepts génétiques classiques, d'une part le concept "un gène - une enzyme" selon lequel le contrôle du métabolisme cellulaire est exercé par les gènes à travers la synthèse des enzymes, d'autre part le concept du dosage génique par lequel chaque allèle d'un gène de structure contribue quantitativement à l'expression du gène.

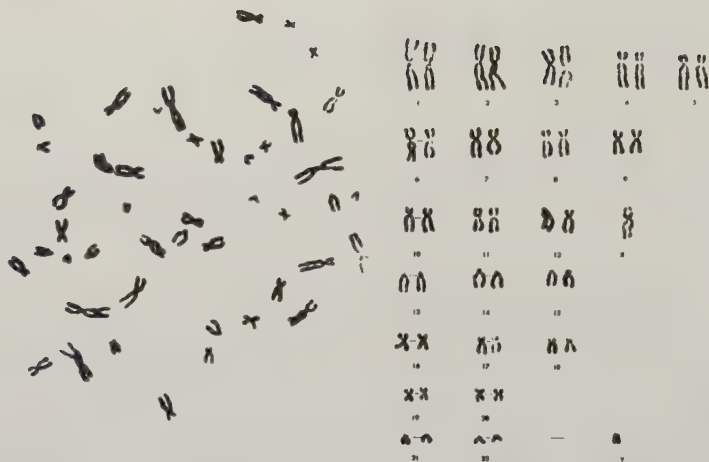


Figure 18 - Caryotype masculin normal 46, XY

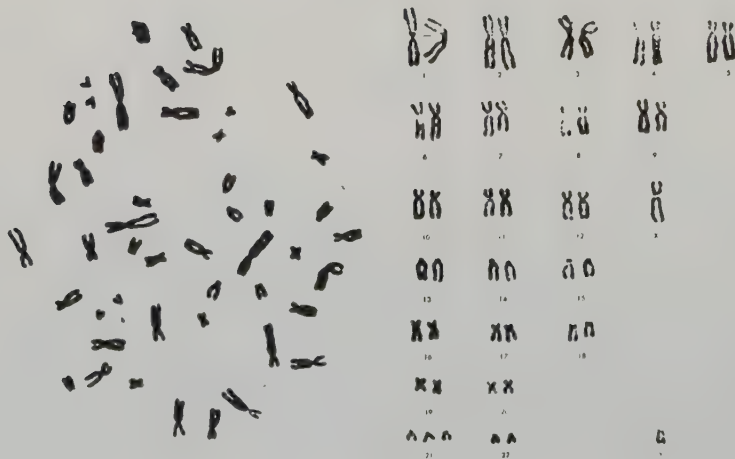


Figure 19 - Trisomie 21 régulière 47, XY, 21+

Résultats

Nous rapportons l'étude des enzymes érythrocytaires de 12 malades porteurs d'anomalies du caryotype, envisageant successivement les anomalies autosomiques, puis celles affectant les gonosomes (Tableau 18).

1 - Anomalies des autosomes

a) Trisomies

Il existe normalement deux gènes allèles sur un locus autosomique; selon le concept du dosage génique ces deux gènes déterminent une activité enzymatique de 100 %, pour laquelle chaque gène contribue pour 50 %.

A l'état trisomique les gènes du chromosome affecté sont au nombre de trois ; si l'on accepte le concept du dosage génique, il devrait logiquement en résulter une activité de 150 % pour les enzymes contrôlées par ces gènes.

Ce raisonnement séduisant est vraisemblablement trop simple, car on sait que des causes diverses sont susceptibles de modifier l'expression d'un gène et rien jusqu'alors ne prouve que le gène supplémentaire soit capable d'exercer une activité à l'état trisomique.

. Trisomie 21 (mongolisme)

Il a été rapporté en 1963 que l'activité de la galactose-1-phosphate uridyl transférase du sang total des sujets mongoliens était d'environ 50 % supérieure aux valeurs normales (163 - 331), ce qui suggéra que le gène de structure de l'enzyme se trouvait probablement situé sur le chromosome 21 (Figure 19).

Depuis, on a montré que cette élévation était due uniquement à l'enzyme des leucocytes, et que d'autres enzymes leucocytaires (phosphatases, G-6PD, etc...) présentaient également une activité augmentée (17 - 119 - 205 322 - 379). En définitive, la multiplicité de ces anomalies suggère actuel-

		Trisomie 21				Trisomie 18	Délétion 5 p -	Délétion 18 q -	Translocation 13/15	D en anneau	Syndrôme XYY	Syndrôme XXI	Syndrôme XYY + translocation 13/15	Limites normales	
	Hématocrite	477	281	365	380	260	670	415	407	270	460	410	500		
	Réticulocytes	1	<0,5	<0,5	1	1	1,5	0,9	-	1	1,1	0,8	1,3		
PHM	Phosphohexomutase	0,30	-	-	0,30	-	-	0,26	0,48	-	0,43	-	0,41	0,16	0,38
HK	Hexokinase	0,40	-	-	0,26	0,28	0,21	0,20	0,27	0,20	0,08	0,22	0,11	0,11	0,25
PHI	Phosphohexoisomérase	-	10,8	7,1	7,4	-	-	12,6	11,6	16,1	16,2	-	12,6	11,3	15,7
PFK	Phosphofructokinase	1,66	1,73	1,90	2,10	-	1,41	1,56	3,15	2,18	6,31	3,07	0,87	2	3,70
Al do	Aldolase	0,67	0,62	0,99	0,46	-	0,67	0,52	0,83	0,74	0,56	0,67	0,66	0,46	0,70
PTI	Phosphotrioseisomérase	761	2470	2270	968	734	681	542	648	790	910	810	963	550	750
GAPD	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	6,8	13	14,2	11,6	6,7	13,6	9,9	14,3	16,8	9,7	12,2	10	9,6	14,6
PGK	Phosphoglycératokinase	33	99	79	48,3	-	32,1	31,2	35	34,5	28	31,4	23	26	36,2
PGM	Phosphoglycératémutase	7,6	9,9	11,4	10,1	4	12,6	8,3	9,9	7,6	6,8	11,7	4,3	4,6	7,8
Enol	Enolase	7,1	6,2	10,2	6,1	-	5,5	4,7	3,9	-	6,3	-	6,4	3,7	5,3
PK	Pyruvatekinase	3,3	3,7	5,4	3	2,4	1,5	3,1	2,1	2,2	2,07	2,23	2,5	1,53	2,53
LDH	Lactico-déshydrogénase	54	46,3	45	40	14,9	33,5	27,1	53	45	29	40,8	26	22	38
G6PD	Glucose-6-phosphate-déshydrogénase	2,70	1,85	2,80	1,63	1,61	1,93	1,46	2,41	2,11	1,42	2,88	1,74	1,48	2,44
6PGD	6-phosphogluconate-déshydrogénase	2,50	1,54	1,71	1,60	0,85	1,87	1,04	2,12	1,50	0,81	1,90	1,32	1,08	1,54
GR	Glutathion réductase	0,81	2,16	1,42	0,81	0,83	0,97	1,21	1,02	1,16	0,78	1,10	0,80	0,80	1,30
	Catalase	422	475	413	534	468	546	-	342	408	552	784	317	472	738

Tableau 18 : ACTIVITES ENZYMATIQUES AU COURS d'ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DIVERSES

lement qu'aucune n'est la conséquence directe de la présence d'un chromosome surnuméraire, mais reflète plutôt un désordre général du métabolisme des leucocytes.

Peu de travaux concernent l'étude des enzymes érythrocytaires. BAIKIE et Coll. (8) ont mesuré en 1965 les activités de 13 enzymes de la glycolyse chez 8 mongoliens ; ces auteurs ont décrit une augmentation constante de la phosphofructokinase d'environ 50 %, et une activité légèrement accrue de l'énolase chez deux malades.

Plus récemment, SPARKES et BAUGHAN (360) étudiant la pyruvate kinase chez une dizaine de sujets, ne décèlent aucune modification de cette activité.

Notre exploration porte sur quatre nourrissons mongoliens. L'examen des résultats permet de dégager les points suivants :

- l'activité de la phosphofructokinase n'est jamais trouvée augmentée, ceci étant en contradiction avec les travaux de BAIKIE et Coll. (8).
- comme ces auteurs, nous retrouvons une légère augmentation de l'énolase chez deux de nos malades
- trois activités sont trouvées nettement augmentées ; ce sont la phosphotriose-isomérase chez trois malades, la 6-phosphogluconate déshydrogénase chez un malade, la glutathion-réductase chez deux malades
- enfin, deux malades présentent une activité diminuée de la phosphohéxose isomérase
- les autres activités enzymatiques sont normales, ainsi que les taux d'ATP et de glutathion réduit.

. Trisomie 18

BAUGHAN et Coll. (13) étudiant cinq malades porteurs de trisomie 18, tous âgés de 2 jours à 9 semaines, trouvent une activité hexokinase considérablement augmentée chez chacun. Compte tenu de l'âge des sujets, il

nous semble difficile de prendre en considération une élévation de cette enzyme dont l'activité se trouve être régulièrement élevée dans les cellules jeunes.

L'étude d'un seul cas de trisomie 18, chez un nourrisson de 18 jours donc dans des conditions d'âge comparables à celles de BAUGHAN et Coll. ne nous a pas permis de mettre en évidence une quelconque augmentation d'activité de l'hexokinase. Par contre, nous avons noté un effondrement de l'activité lactico-déshydrogénase, tandis que toutes les autres enzymes mesurées étaient normales.

b) Délétions

. Délétion 5 p- (syndrome du cri du chat)

Mesurées chez un malade, les activités enzymatiques sont toutes trouvées normales ; il en est de même chez les parents. Nous n'avons pas trouvé de travaux dans la littérature permettant de comparer ces résultats à ceux d'autres auteurs.

. Délétion 18 q-

A l'exception d'une diminution non significative de la phosphofructokinase, toutes les activités enzymatiques du sujet étudié sont normales ; des résultats identiques ont été rapportés en 1970 par LAURENT et Coll. (222) lors de l'étude d'une délétion du bras court du même chromosome 18.

c) Translocation

L'étude des activités enzymatiques d'un cas de translocation 13/15, pour lequel nous avons pu mettre en évidence une anomalie familiale du taux d'haptoglobine, ne décèle aucun déficit, mais montre assez bizarrement une élévation légère d'un certain nombre d'activités enzymatiques : phosphohexomutase, aldolase, phosphoglycératemutase, lactico-déshydrogénase, 6-phosphogluconate déshydrogénase.

d) Chromosome en anneau

L'étude d'un malade porteur d'un chromosome 14 en anneau suggère que cette anomalie n'entraîne aucune modification des enzymes érythrocytaires.

2 - Anomalies des gonosomes

En dehors de la G-6PD, on ne connaît pas actuellement d'enzymes érythrocytaires liées au sexe ; l'étude de la transmission d'un déficit en phosphoglycérate kinase réalisée par VALENTINE et Coll. (381) en 1969 semblait en faveur d'une liaison avec le chromosome X, mais cette hypothèse ne paraît pas se confirmer dans l'exploration d'un nouveau cas de déficit en cette enzyme actuellement en cours d'étude en France (229).

Nous avons eu l'occasion de mesurer les activités enzymatiques de trois malades porteurs d'anomalies différentes des chromosomes sexuels.

- Syndrome XYY (super-mâle) : les activités enzymatiques sont normales à l'exception d'une augmentation nette et non expliquée de la phosphofructokinase.
- Syndrome XXY : les activités enzymatiques sont normales.
- Syndrome XXYY + translocation 13/15 : les activités enzymatiques sont normales.

Discussion

Il est évident que l'étude de douze cas d'anomalies chromosomiques aussi dispersés dans leur nature ne pouvait prétendre conduire à des conclusions spectaculaires sans le concours du hasard ; seule l'accumulation d'études de cas exactement semblables en nombre suffisant permettra d'émettre des hypothèses. Des résultats obtenus, nous pouvons néanmoins dire que :

1°) Nous n'avons jamais retrouvé les variations d'activité observées par quelques auteurs dans les trisomies 18 et 21. Dans l'état actuel des recherches, et si l'on tient pour valable le concept du dosage génique, on peut penser qu'aucun gène de structure des enzymes érythrocytaires étudiées ne se trouve lié au chromosome 21.

2°) Plutôt que la localisation des gènes, les preuves d'exclusion seront vraisemblablement plus accessibles. De ce point de vue, le fait de trouver des activités enzymatiques normales lors d'une délétion des bras longs, tandis que LAURENT et Coll (222) rapportent des activités également normales au cours d'une délétion du bras court du même chromosome 18, est en faveur de l'absence de gènes de structure des enzymes érythrocytaires liées à ce chromosome.

3°) Les variations d'activité des enzymes érythrocytaires, en dehors des limites normales, apparaissent relativement fréquentes au cours des anomalies chromosomiques, mais ne semblent nullement spécifiques d'une enzyme ou d'un chromosome.

CONCLUSION

On a coutume de dire que le progrès d'une question en science se reconnaît d'ordinaire à ce que les grandes lignes s'épurent tandis que s'embrouillent les petits détails.

Il en va ainsi du chapitre des érythroenzymopathies, domaine nouveau de l'hématologie, qui s'est édifié en un peu plus de dix années.

L'enzymopathologie du globule rouge s'impose aujourd'hui comme une entité bien définie : la plupart des déficits connus sont bien individualisés, les conséquences cliniques répertoriées, leurs méthodes d'exploration définies. Il n'en reste pas moins vrai que la compréhension de leur mécanisme, leur mode de transmission, leur relation logique avec les faits cliniques, etc... demeurent pour la plupart suppositions ou, au mieux, hypothèses.

Comparés à la multitude et à la complexité des questions à résoudre, les résultats de ce travail apparaîtront nécessairement fort modestes.

L'étude bibliographique, qui en constitue la première partie, répond au premier but que nous nous étions fixé : faire le point des connaissances actuelles des érythroenzymopathies.

Les résultats exposés dans les différents chapitres de notre étude expérimentale, sont susceptibles d'être rassemblés sous deux rubriques selon que leur apport est d'ordre plus spécialement pratique ou théorique.

Considérations pratiques.

1. - La réalisation d'un bilan enzymatique érythrocytaire, devenu

examen de routine pour quelques laboratoires très spécialisés, demeure un problème délicat.

Notre expérience nous incite, après d'autres, à attirer l'attention sur la difficulté qu'il y a dans l'interprétation des variations des activités enzymatiques. Elle requiert une grande prudence car la précision en valeur absolue et la reproductibilité des résultats demeurent relativement faibles étant donné le nombre important de paramètres capables d'apporter des modifications actuellement peu contrôlables (irrégularité de la qualité des réactifs, examen pratiqué sur une population érythrocytaire hétérogène, etc...).

Ces difficultés nous amènent à souligner à nouveau une notion essentielle : l'obligation de toujours travailler par rapport à un témoin traité dans des conditions strictement identiques, et l'absolue nécessité pour chaque laboratoire d'établir sur un nombre suffisant d'échantillons ses propres normalités (Chap. I).

2. - La nouvelle méthode de mesure de la galactokinase érythrocytaire que nous proposons, demande le même matériel, le même hémolysat, les mêmes réactifs que ceux déjà utilisés pour la détermination des autres activités enzymatiques. Elle s'intègre donc sans aucune difficulté nouvelle dans le bilan, facilitant ainsi l'organisation du travail au laboratoire (chap. II).

La grande rapidité de sa réalisation, comparée aux mesures isotopiques, répond correctement aux besoins des cliniciens, d'autant plus qu'il s'agit d'une microméthode.

Enfin, elle s'accommode facilement du dosage en série. Elle devrait donc contribuer à instaurer un dépistage systématique du déficit en galactokinase dont la rareté n'a vraisemblablement d'égale que l'absence de recherche et dont les conséquences graves méritent un effort de dépistage compara-

ble à celui réalisé dans certains centres au profit de la galactosémie classique.

De ce point de vue, l'automatisation de la méthode proposée ne devrait pas présenter de difficultés majeures.

Considérations théoriques.

1. - La mise au point d'une méthode de mesure de la mobilité électrophorétique de la galactokinase érythrocytaire met à la disposition des chercheurs un nouveau critère d'étude des propriétés physico-chimiques de la galactokinase. Dans les conditions employées, l'enzyme ne présente qu'une seule bande d'activité dans les hématies de l'adulte ou dans celles du cordon (Chap. II).

2. - La mesure des activités enzymatiques des hématies du sang du cordon, entreprise initialement dans un but essentiellement pratique (améliorer l'interprétation des activités enzymatiques trouvées chez le nouveau-né et le nourrisson) a dépassé nos espérances (Chap. III).

Les très grandes différences d'activité relevées dans le sang du cordon comparé au sang adulte, nous a conduit à décider l'étude qualitative des enzymes.

Ce travail réalisé pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase nous porte à croire que l'enzyme du cordon et l'enzyme adulte diffèrent non seulement quantitativement mais aussi qualitativement. Nous avons d'ailleurs retrouvé des modifications allant dans le même sens pour la galactokinase et l'hexokinase apportant ainsi une contribution aux hypothèses formulées en 1969 par OSKI (284).

La connaissance de telles différences est d'une importance primordiale pour l'étude ontogénique des enzymes érythrocytaires. On peut même

penser, appuyé en cela par la récente mise à jour de possibles récurrences des protéines foetales dans les états cancéreux, que l'étude des formes moléculaires des enzymes érythrocytaires foetales pourrait apporter un précieux concours dans la compréhension de certaines hémopathies.

Ces propos indiquent que l'étude des propriétés qualitatives des enzymes foetaux devrait constituer une voie de recherche féconde.

3. - La détermination des propriétés physico-chimiques d'une molécule enzymatique responsable d'un déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase chez un Européen porteur d'une anémie hémolytique chronique, non sphérocytaire, nous a permis d'individualiser une variante nouvelle de l'enzyme, dont l'appellation proposée, selon les règles de la Commission de Nomenclature de l'Organisation Mondiale de la Santé, est Gd (-) NANCY (Chap. IV - A).

4. - L'étude électrophorétique de la diaphorase NADH-dépendante chez deux soeurs atteintes par le déficit et chez leurs parents ne nous a pas permis de mettre en évidence de bande de mobilité anormale. La débilité mentale associée au déficit chez l'une des patientes ne semble donc pas liée à l'existence d'une forme moléculaire anormale révélable par électrophorèse (Chap. IV - B).

5. - Nous avons mis en évidence un déficit en galactokinase érythrocytaire chez un nouveau-né. Cette étude est à rapprocher du cas rapporté par TALHAMMER et GITZELMANN en 1963 (375) ; elle s'en distingue par son caractère partiel et transitoire, particularité qui, à notre connaissance, n'a été encore jamais rapportée dans la littérature à ce jour (Chap. IV - C).

6. La mesure des activités enzymatiques érythrocytaires chez les porteurs d'anomalies du caryotype répond à une hypothèse séduisante. Il est évident que l'étude de douze cas seulement, d'ailleurs fort dissemblables, ne pouvait sans le concours du hasard, aider à la localisation des gènes structuraux sur les chromosomes.

Les résultats obtenus, associés aux quelques travaux relatés jusqu'alors, nous font croire que ni le chromosome 21, ni le chromosome 18 ne seraient porteurs de gènes de structure des enzymes érythrocytaires.

Cette étude devra être poursuivie puisque seule l'accumulation de cas en nombre suffisant permettra des conclusions valables (Chap. V).

Comme on le voit, les recherches entreprises l'ont été dans des domaines fort divers, cette hétérogénéité involontaire nous étant dictée par la rareté et la disponibilité du "matériel de base". Les différents résultats obtenus contribuent modestement à démontrer l'intérêt que peut revêtir l'enzymologie pathologique.

Dans le domaine des érythroenzymopathies, on ne voit pas encore très bien comment il serait possible d'éviter au moins les conséquences les plus graves, mais il est par trop évident qu'un tel but ne peut se concevoir qu'à travers une connaissance toujours plus profonde des enzymes érythrocytaires et des mécanismes qui président à leur activité.

De tels progrès résulteront inévitablement de l'apport d'autres disciplines que l'enzymologie, telles que la culture des tissus, l'immunologie, la génétique... Ils ne sauraient se réaliser sans la collaboration étroite de la biochimie et de l'hématologie.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - AEBI (H.)
La catalase érythrocytaire.
Exposés Annuels de Biochimie Médicale, 29e série,
Masson Ed. Paris, 1969
- 2 - AEBI (H.), BOSSI (E.), CANTZ (M.), MATSUBARA (S.), SUTER (H.)
Acatalesia in Switzerland.
in Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism,
Beutler E. Ed., Grune and Stratton, N.Y. 1968
- 3 - ALAGILLE (D.), FLEURY (J.), ODIEVRE (M.)
Déficit congénital en 2,3 diphosphoglycérémotase.
Bull. Soc. Med. Hôp. Paris, 1964, 115, 483.
- 4 - ALLESSANDRI (A.d')
The stability of erythrocyte glutathione reductase.
Helv. Med. Acta, 1969, 35, 118.
- 5 - ANDERSON (E.P.), KALCKAR (H.M.), KURAHASHI (K.), ISSELBACHER (K.J.)
A specific enzymatic assay for the diagnosis of congenital
galactosemia. I. The consumption test.
J. Lab. clin. Med., 1957, 61, 469-477.
- 6 - ANGELOPOULOS (B.), KARALIS (D.), TSOUKANTAS (A.),
ELEFThERIADOU (A.)
Hereditary methemoglobinemia due to DPNH methemoglobin reduc-
tase deficiency. Report of a family.
Acta Haemat., 1967, 37, 284-293.
- 7 - ASAKUTA (T.), SATO (Y.), MINAKAMI (S.), YOSHIKAWA (H.)
pH dependency of 2,3-diphosphoglycerate content in red blood
cells.
Clin. Chim. Acta, 1966, 14, 840-841.
- 8 - BAIKIE (A.G.), BRONWEN LODER (P.), DE GRUCHY (G.C.), PITT (D.B.)
Phosphohexokinase activity of erythrocytes in mongolism.
Lancet, 1965, 1, 412.
- 9 - BALLARD (E.J.)
Purification and properties of galactokinase from pig liver.
Biochem. J., 1966, 98, 347-352.

- 10 - BAMJI (M.S.)
Glutathione reductase activity in red blood cells and ribo-
flavin nutritional status in humans.
Clin. Chim. Acta, 1969, 26, 263.
- 11 - BARTHELMAI (W.)
Die Entroicklung der enzymaktivitäten in erythrocyten
während des Kindlichen lebensalters.
Wschr. Kinderheilk., 1968, 116, 410.
- 12 - BARTLETT (G.R.), BUCOLO (G.)
The metabolism of ribonucleoside by the human erythrocyte.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 156, 240-253.
- 13 - BAUGHAN (M.A.), SPARKES (R.S.), PAGLIA (D.E.), WILSON (M.G.)
Blood cell enzymes in trisomy E (18) syndrome.
J. Med. Genet., 1969, 6, 42.
- 14 - BAUGHAN (M.A.), VALENTINE (W.N.), PAGLIA (D.E.), WAYS (P.O.),
SIMONS (E.R.), DE MARSH (Q.B.)
Hereditary hemolytic anemia associated with glucose phosphate
isomerase deficiency - a new enzyme defect of human erythro-
cytes.
Blood, 1968, 32, 236.
- 15 - BENBASSAT (J.), BEN-ISHAY (D.)
Hereditary hemolytic anemia associated with G.6PD deficiency
(Mediterranean type)
Israël J. Med. Sci., 1969, 5, 1053-1059.
- 16 - BENESCH (R.), BENESCH (R.E.)
The effect of organic phosphates from the human erythrocyte
on the allosteric properties of hemoglobin.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1967, 26, 162.
- 17 - BENSON (P.F.)
Leucocyte hexokinase isoenzymes in Down's syndrome.
Lancet, 1968, 1, 197.
- 18 - BENTEGEAT (J.), VERGER (P.), JOIGNY (C.de), BOISSEAU (M.),
ROULAUD (F.)
Variations dans l'expression du déficit érythrocytaire en py-
ruvate kinase.
Nouv. Rev. fr. Hemat., 1968, 8, 856-863.
- 19 - BENTLEY (R.), SWEeley (C.C.), MAKITA (M.), WELLS (W.W.)
Gas chromatography of sugars and other polyhydroxy coumpounds.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1963, 11, 14-18.

- 20 - BERGMEYER (H.U.)
Methods of enzymatic analysis.
Academic Press. Ed. N.Y. 1965
- 21 - BERKALOFF (A.), BOURGUET (J.), FAVARD (P.), GUINEBAULT (M.)
in Biologie et Physiologie cellulaire
Hermann Edit., Paris 1969
- 22 - BERNARD (J.), DREYFUS (J.C.)
Hémolyse aiguë familiale et déficit de la G.6PD des érythrocytes.
Nouv. Rev. fr. Hémat., 1962, 2, 135.
- 23 - BERNARD (J.), NAJEAN (Y.), SCIALOM (C.), TANZER (J.)
Les manifestations aiguës du déficit en G.6PD.
Soc. Med. Hôp. Paris, 1964, 115, 439.
- 24 - BERNARD (J.), RUFFIE (J.)
Hématologie géographique.
Masson et Cie, Ed. Paris, 1966
- 25 - BERNARD (J.), TANZER (J.), NAJEAN (Y.), MOULINIER (J.),
SCIALOM (C.), LEVY (J.P.), PETROVER (M.)
La forme chronique de l'anémie hémolytique héréditaire par insuffisance en G.6PD. Observations préliminaires sur une famille française.
Nouv. Rev. fr. Hémat., 1963, 3, 465.
- 26 - BERNSTEIN (R.E.)
Alterations in metabolic energetics and cation transport during aging of red cells.
J. Clin. Invest., 1959, 38, 1572-1586.
- 27 - BEUTLER (E.)
The glutathione instability of drug sensitive red cells. A new method for the in vitro detection of drug sensitivity.
J. Lab. Clin. Med., 1957, 49, 84.
- 28 - BEUTLER (E.)
A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, G.6PD deficiency and glutathione reductase deficiency.
Blood, 1966, 28, 553-562.
- 29 - BEUTLER (E.)
The genetics of G.6PD deficiency.
in Hereditary Disorders of erythrocyte metabolism,
Beutler E., Ed. Grune and Stratton, N.Y. 1968

- 30 - BEUTLER (E.)
Electrophoresis of phosphoglycerate kinase.
Biochem. Gen., 1969, 3, 189.
- 31 - BEUTLER (E.)
Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity :
in vitro and in vivo studies.
J. Clin. Invest., 1969, 48, 1957-1966.
- 32 - BEUTLER (E.)
Drug-induced hemolytic anemia.
Pharmacol. Rev., 1969, 21, 73-97.
- 33 - BEUTLER (E.)
Glutathione reductase : stimulation in normal subjects by ribo-
flavin supplementation.
Science, 1969, 165, 613.
- 34 - BEUTLER (E.)
Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency.
Brit. J. Haemat., 1970, 18, 117-121.
- 35 - BEUTLER (E.), BALUDA (M.C.), KELLY (B.M.)
The role of methemoglobin in the mechanism of drug induced he-
molytic anemia.
in Proc. IXth Cong. Intern. Soc. Hemat., Mexico City, 1962
- 36 - BEUTLER (E.), BALUDA (M.C.)
Improved method for measuring galactose-1-phosphate uridyl
transferase activity of erythrocytes.
Clin. Chim. Acta, 1966, 13, 369-379.
- 37 - BEUTLER (E.), BALUDA (M.C.)
Biochemical properties of human red cell galactose-1-phosphate
uridyltransferase from normal and mutant subjects.
J. Lab. Clin. Med., 1966, 67, 947-954.
- 38 - BEUTLER (E.), MATHAI (C.K.)
Genetic variation in red cell galactose-1-phosphate uridyl
transferase.
in Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism,
Beutler E. Ed., Grune and Stratton, N.Y. 1968
- 39 - BEUTLER (E.), MATHAI (C.K.), SMITH (J.E.)
Biochemical variants of G.6PD giving rise to congenital non-
spherocytic hemolytic disease.
Blood, 1968, 31, 131-150.

- 40 - BEUTLER (E.), MITCHELL (M.)
New rapid method for the estimation of red cell galactose-1-phosphate uridyl transferase activity.
J. Lab. Clin. Med., 1968, 72, 527-532.
- 41 - BEUTLER (E.), ROSEN (R.)
Nonspherocytic congenital hemolytic anemia due to a new G.6PD variant : G.6PD Alhambra.
Pediatrics, 1970, 45, 230-235.
- 42 - BEUTLER (E.), TEEPLE (L.)
The effect of oxidized glutathione on human erythrocyte hexokinase activity.
Acta biol. med. germ., 1969, 22, 707-711.
- 43 - BEUTLER (E.), YEH (M.K.Y.)
Erythrocyte glutathione reductase.
Blood, 1963, 21, 573.
- 44 - BEUTLER (E.), YEH (M.K.Y.), FAIRBANKS (V.F.)
The normal human female as a mosaic of X chromosome activity : studies using the gene for G.6PD deficiency as a marker.
Proc. Nat. Acad. Sci., 1962, 48, 1.
- 45 - BIESOLD (D.), TEICHGRABER (P.), BIGL (V.)
Biochemical properties of brain hexokinase.
FEBS Prague, 1968, Abstract 63
- 46 - BIGLEY (R.H.)
Tissue distribution of human pyruvate kinase isozymes.
Enzymol. biol. clin., 1968, 9, 10.
- 47 - BLACKWELL (R.Q.), RO (I.H.), YEN (L.)
Low incidence of erythrocyte G.6PD deficiency in Koreans.
Vox Sang., 1968, 14, 299-303.
- 48 - BLONDEL de JOIGNY (C.)
Contribution à l'étude des anémies hémolytiques congénitales non sphérocytaires par déficit en pyruvate kinase.
Thèse Med., Bordeaux 1967
- 49 - BLOOM (G.E.), ZARKOWSKY (H.S.)
Heterogeneity of the enzymatic defects in congenital methemoglobinemia.
New Engl. J. Med., 1969, 281, 919.
- 50 - BLUME (K.G.), GOTTLIK (M.), LOHR (G.W.), RUDIGER (H.W.)
Familien untersuchungen zum glutathionreduktase mangel menschlicher erythrocyten.
Humangenetik, 1968, 6, 163-170.

- 51 - BLUME (K.G.), RUDIGER (H.W.), LOHR (G.W.)
Electrophoresis of glutathione reductase from human red blood cells.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 151, 686-688.
- 52 - BOERY (J.C.), HIRSCH (J.), DE GRUCHY (G.C.)
Erythrocyte and platelet glucose-6-phosphate dehydrogenase in normal and mutant caucasians.
Scand. J. Haemat., 1969, 6, 5-9.
- 53 - BOGUSLAWSKA-JAWORSKA (J.), KWIATKOWSKA (J.), BARANOWSKI (T.)
Studies on glycolysis of red blood cells in anemias. I. Congenital microspherocytosis.
Arch. Immunol., 1966, 14, 478.
- 54 - BOIVIN (P.)
Erythroenzymopathies.
Nouv. Rev. fr. Hemat., 1966, 6, 769-808.
- 55 - BOIVIN (P.)
La synthèse du glutathion par les hématies et ses anomalies.
in Exposés Annuels de Biochimie Médicale, 29e série,
Masson Ed. Paris, 1969
- 56 - BOIVIN (P.)
Progrès dans les anémies hémolytiques congénitales.
Rev. Prat., 1969, 19, 91-106.
- 57 - BOIVIN (P.), GALAND (G.)
La synthèse du glutathion au cours de l'anémie hémolytique congénitale avec déficit en glutathion réduit. Déficit congénital en glutathion synthetase érythrocytaire ?
Nouv. Rev. fr. Hémat., 1965, 7, 707-720.
- 58 - BOIVIN (P.), GALAND (C.)
Les anémies enzymopéniques, un bilan.
Path. Biol., 1967, 15, 1089-1095.
- 59 - BOIVIN (P.), GALAND (C.)
Constante de Michaelis anormale pour le phospho-enol-pyruvate au cours d'un déficit en pyruvate kinase érythrocytaire.
Rev. fr. Et. clin. biol., 1967, 12, 372-374.
- 60 - BOIVIN (P.), GALAND (C.)
Recherche d'une anomalie moléculaire lors des déficits en pyruvate kinase érythrocytaire.
Nouv. Rev. fr. Hemat., 1968, 8, 201-208.

- 61 - BOIVIN (P.), GALAND (C.)
Nouvelles variantes de la glucose-6-phosphate déshydrogénase érythrocytaire.
Rev. fr. Et. clin. biol., 1968, 13, 30.
- 62 - BOIVIN (P.), GALAND (C.), ANDRE (R.), DEBRAY (J.)
Anémies hémolytiques congénitales avec déficit isolé en glutathion réduit par déficit en glutathion synthétase.
Nouv. Rev. fr. Hémat., 1966, 6, 859-866.
- 63 - BOIVIN (P.), GALAND (C.), HAKIM (J.), BLERY (M.)
Déficit en glutathion-peroxydase érythrocytaire et anémie hémolytique médicamenteuse.
Presse Med., 1970, 78, 171-174.
- 64 - BOIVIN (P.), GALAND (C.), HAKIM (J.), ROGE (J.), GUEROULT (N.)
Anémie hémolytique avec déficit en glutathion peroxydase chez un adulte.
Enzymol. Biol. clin., 1969, 10, 68-80.
- 65 - BOIVIN (P.), GALAND (C.), MALLARME (J.), PERROT (R.)
Mise en évidence d'une enzyme à cinétique anormale dans deux nouveaux cas de déficit en pyruvate kinase érythrocytaire.
Path. Biol., 1969, 17, 597-607.
- 66 - BOIVIN (P.), HAKIM (J.)
Les variantes de la G.6PD.
Path. Biol., 1969, 17, 629-636.
- 67 - BOIVIN (P.), PIGUET (H.), GALAND (C.)
Anomalies des enzymes de la dégradation du glucose érythrocytaire.
Nouv. Rev. fr. Hémat., 1966, 6, 769-808.
- 68 - BONSIGNORE (A.), FORNAINI (G.), FANTONI (A.), LEONCINI (G.)
Purificazione e proprieta della G.6PD dei leucociti e degli eritrociti umani.
Ital. J. Biochem., 1965, 14, 218.
- 69 - BONSIGNORE (A.), FORNAINI (G.), LEONCINI (G.), FANTONI (A.),
SEgni (P.)
Characterization of leukocyte G.6PD in sardinian mutants.
J. Clin. Invest., 1966, 45, 1865-1874.
- 70 - BOUSSER (J.), CHRISTOL (D.), BOIVIN (P.), MALLASENET (R.),
LODS (J.C.)
Ictère hémolytique congénital non sphérocytaire avec déficit en G.6PD. Deux observations.
Nouv. Rev. fr. Hémat., 1963, 3, 505.

- 71 - BOUSSER (J.), BOIVIN (P.)
L'anémie hémolytique chronique avec déficit en G.6PD.
Soc. Med. Hôp. Paris, 1964, 115, 467.
- 72 - BOWLER (A.J.), PRANKERD (T.A.J.)
Studies on congenital non spherocytic hemolytic anemias with specific enzyme defects.
Acta Haemat., 1964, 31, 65.
- 73 - BRABEC (V.), MIRCEVOVAL (L.), PALEK (J.)
Adenosine triphosphatase activity of the red cell membrane in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria.
Brit. J. Haemat., 1969, 16, 421-428.
- 74 - BRACCI (R.), CORVAGLIA (E.), PRINCI (P.), BETTINI (F.), PINDINELLI (C.)
The role of GSH-peroxidase deficiency in the increase susceptibility to Heinz body formation in the erythrocytes of newborn infants.
Ital. J. Biochem., 1969, 18, 100.
- 75 - BRACCI (R.), SEELE (R.), RUDOLF (N.), KOCHEN (J.A.), GROSS (R.T.)
Erythrocyte glutathione peroxidase activity and hydrogen sensitivity a mechanism of drug induced hemolysis in the newborn.
Ann. Meet. Soc. Pediat. Res., Mai 1965
- 76 - BRETTHAUER (R.K.), HANSEN (R.G.), DONNELL (G.), BERGREN (W.R.)
A procedure for detecting carriers of galactosemia.
Proc. Natl. Acad. Sc., USA, 1959, 45, 328-331.
- 77 - BREWER (G.J.), DERN (R.J.)
A new inherited enzymic deficiency of human erythrocytes 6-phosphogluconate dehydrogenase deficiency.
Amer. J. Hum. Gen., 1964, 16, 472.
- 78 - BRITTON (H.G.), CLARKE (J.B.)
The mechanism of the phosphoglycerate mutase reaction.
Biochem. J., 1969, 112, 10.
- 79 - BURTON (P.M.)
Kinetics of triose phosphate isomerase.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 151, 714.
- 80 - BURTON (P.M.), WALEY (G.)
Studies on the sub-units of triose phosphate isomerase.
Biochem. J., 1968, 107, 737.
- 81 - CAMPOS (J.O.), KOLER (R.D.), BIGLEY (R.H.)
Kinetic differences between human red cell and leucocyte pyruvate kinase.
Nature, 1965, 208, 194.

- 82 - CANFIELD (C.J.), HERMAN (Y.F.), HERMAN (R.H.), CONRAD (M.E.)
Refractory hemolytic disease associated with G.6PD deficiency and hemosiderosis : report of a case.
J. Lab. Clin. Med., 1965, 66, 96.
- 83 - CARSON (P.E.)
G.6PD deficiency in hemolytic anemia.
Fed. Proc., 1961, 19, 995-1006.
- 84 - CARSON (P.E.), BREWER (G.J.), ICKES (C.)
Decreased glutathione reductase with susceptibility to hemolysis.
J. Lab. Clin. Med., 1961, 58, 804.
- 85 - CARSON (P.E.), TARLOV (A.R.)
Biochemistry of hemolysis.
Ann. Rev. Med., 1962, 13, 105.
- 86 - CARTER (N.D.), YOSHIDA (A.)
Purification and characterization of human phosphoglucose isomerase.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 181, 12-19.
- 87 - CARTIER (P.)
Exposes annuels de biochimie médicale, 29e série
Masson Ed., Paris 1969
- 88 - CARTIER (P.)
Communication personnelle
- 89 - CARTIER (P.), LEROUX (J.P.), MARCHAND (J.C.)
Techniques de dosage des enzymes glycolytiques tissulaires.
Ann. Biol. clin., 1967, 25, 109-136.
- 90 - CARTIER (P.), LEROUX (J.P.), TEMKINE (H.), NAJMAN (A.), ANDRE (R.)
Etude biochimique de deux cas de déficits congénitaux en pyruvate kinase.
Nouv. Rev. fr. Hémat., 1968, 8, 854-856.
- 91 - CARTIER (P.), MARCHAND (J.C.), GARREAU (H.)
La séparation de cellules sanguines.
Ann. Biol. clin., 1969, 27, 133-157.
- 92 - CARTIER (P.), NAJMAN (A.), LEROUX (J.P.), TEMKINE (H.)
Les anomalies de la glycolyse au cours de l'anémie hémolytique par déficit du globule rouge en pyruvate kinase.
Clin. Chim. Acta, 1968, 22, 165-181.

- 93 - CARTIER (P.), TEMKINE (H.)
Le 2,3 diphosphoglycerate et le glucose-1,6-diphosphate
du globule rouge : techniques de dosage.
Ann. Biol. clin., 1967, 25, 1119-1128.
- 94 - CARTIER (P.), TEMKINE (H.), GRISCELLI (C.)
Etude biochimique d'une anémie hémolytique avec déficit fami-
lial en phosphohexoisomérase.
VIIème Congrès de Chimie Clinique, Genève-Evian, Sept. 1969
- 95 - CARTIER (P.), TEMKINE (H.), LEROUX (J.P.)
Caractères cinétiques de deux formes interconvertibles de py-
ruvate kinase dans le globule rouge humain.
C.R. Acad. Sci. Paris, 1968, 266, 1680-1682.
- 96 - CHAPMAN (R.G.)
Red cell aldolase deficiency in hereditary spherocytosis.
Brit. J. Haemat., 1969, 16, 145.
- 97 - CHAPMAN (R.G.), SANNER (T.), PIHL (A.)
Modification of regulatory properties of phosphofructokinase
by acetylation.
Europ. J. Biochem., 1969, 7, 588-593.
- 98 - CHILDS (B.), ZINKHAM (W.), BROWNE (E.A.), KIMBRO (E.L.),
TORBERT (J.V.)
A genetic study of a defect in glutathione metabolism of the
erythrocytes.
Bull. Johns Hop. Hosp., 1958, 102, 21.
- 99 - CHUNG (A.E.), LANGDON (R.G.)
Human erythrocyte G.6PD.
J. Biol. chem., 1963, 238, 2309.
- 100 - CIRESA (M.), HUBER (H.), DITTRICH (P.V.)
Glucose-6-phosphate dehydrogenase und Lebensdauer der Erythro-
cyten bei verschiedenen Anämieformen.
Klin. Wschr., 1964, 42, 647.
- 101 - CODOUNIS (A.)
Hereditary methemoglobinemic cyanosis.
Brit. Med. J., 1952, 2, 368-371.
- 102 - COHEN (G.), HOCHSTEIN (P.)
Glutathione peroxidase : the primary agent for the elimination
of hydrogen peroxyde in erythrocytes.
Biochemistry, 1963, 2, 1420.

- 103 - COHN (R.), SEGAL (S.)
Some characteristics and developmental aspects of rat uridine diphosphogalactose-4-epimerase.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 171, 333-341.
- 104 - COLLIER (H.B.), ASHFORD (D.R.), DELL (R.E.)
Three cases of hemolytic anemia with erythrocyte pyruvate kinase deficiency in Alberta.
Canad. Med. Ass. J., 1966, 95, 1188-1192.
- 105 - COPENHAVER (J.H.), BAUSCH (L.C.), FITZGIBBONS (J.F.)
A fluorometric procedure for estimation of galactose-1-phosphate uridylyltransferase activity in red blood cells.
Anal. Biochem., 1969, 30, 327-338.
- 106 - CORSINI (F.)
L'aldolasi nei globuli rossi.
Clin. Ped., 1958, 40, 331.
- 107 - CORSINI (F.), CACCIARI (E.), MANFREDI (G.), PINTOZZI (P.)
Attività aldolasica e transaminasica negli eritrociti totali e negli stromi eritrocitari.
Boll. Soc. Ital. biol. Sper., 1959, 35, 393.
- 108 - COTTE (J.), KISSIN (C.), MATHIEU (M.), CUIVRE (M.), FREYCON (F.)
Notre expérience de deux ans d'enzymologie globulaire en pédiatrie. A propos de 250 cas.
Ann. Biol. clin., 1967, 25, 1129-1154.
- 109 - CRAVEN (P.A.), BASFORD (R.E.)
Brain hexokinase : immunohistochemical localization at the light microscopic level.
Biochem., 1969, 8, 3520-3525.
- 110 - CUATRECASAS (P.), SEGAL (S.)
Mammalian galactokinase. Developmental and adoptive characteristics in the rat liver.
J. Biol. Chem., 1965, 240, 2382-2388.
- 111 - DAWSON (D.M.), MITCHELL (A.)
The isoenzymes of phosphoglucomutase.
Biochemistry, 1969, 8, 609-614.
- 112 - DERN (R.J.), Mc CURDY (P.R.)
A new structural variant of G.6PD with a high production rate (G.6PD Hektoen)
J. Lab. Clin. Med., 1969, 73, 283.

- 113 - DETTER (J.C.), ANDERSON (J.E.), GIBLETT (E.R.)
NADH diaphorase : an inherited variant associated with normal methemoglobin reduction.
Amer. J. Hum. Gen., 1970, 22, 100-104.
- 114 - DICK (D.A.T.), DICK (E.G.), TOSTEON (D.C.)
Inhibition of adenosine triphosphatase in sheep red cell membranes by oxidized glutathione.
J. Physiol., 1969, 54, 123-133.
- 115 - DIEDERICH (A.), DIEDERICH (D.), LUQUE (J.), GRISOLIA (S.)
Binding of 2,3 diphosphoglycerate (2,3 DPGA) to hemoglobin. Isolation of peptides containing firmly bound 2,3 DPGA.
FEBS Letters, 1969, 5, 7-10.
- 116 - DIKOW (A.L.), GENOVA (V.G.)
Isoenzymfraktionen der fructose-phosphat-aldolase in den Blutzellen gesunder Menschen.
Z. Klin. chem. u. Klin. Biochem., 1969, 7, 155-157.
- 117 - DOERY (J.C.G.), HIRSCH (J.), DE GRUCHY (G.C.)
Erythrocyte and platelet G.6PD in normal and mutant caucasians.
Scand. J. Haemat., 1969, 6, 5.
- 118 - DONNELL (G.N.), NG (W.G.), HUDGMAN (J.E.), BERGREN (W.R.)
Galactose metabolism in the newborn infant.
Pediatrics, 1967, 39, 829-837.
- 119 - DONNELL (G.N.), NG (W.G.), BERGREN (W.R.), MELNYK (J.), KOCH (R.)
Enhancement of erythrocyte galactokinase activity in Langdon-down trisomy.
Lancet, 1965, 1, 553.
- 120 - DOXIADIS (S.A.), FESSAS (P.), VALAES (T.)
Erythrocyte enzyme deficiency in unexplained kernicterus.
Lancet, 1960, 1, 44.
- 121 - DOXIADIS (S.A.), FESSAS (P.), VALAES (T.), MASTROKALOS (N.)
G.6PD deficiency. A new etiological factor of severe neo-natal jaundice.
Lancet, 1961, 1, 297.
- 122 - DOXIADIS (S.A.), VALAES (T.), KARAKLIS (A.), STAVRAKAKIS (D.)
Risk of severe jaundice in G.6PD deficiency newborn.
Lancet, 1964, 2, 1210.
- 123 - DREYFUS (J.C.)
Glucose-6-phosphate déshydrogénase.
Exposés Annuels de Biochimie Médicale, 29e série,
Masson et Cie, Ed, Paris 1969

- 124 - DUBIN (J.C.), BERNARD (S.)
Purification de la pyruvate kinase du globule rouge humain.
Clin. Chim. Acta, 1967, 16, 63-68.
- 125 - DUCAS (J.)
Contribution à l'étude d'une erreur congénitale du métabolisme : le déficit en G.6PD.
Thèse Med., Nancy 1961
- 126 - DUHM (J.), DEUTICKE (B.), GERLACH (E.)
Abhängigkeit der 2,3-diphosphoglycerinsäure. Synthese in Menschen-Erythrocyten von der ADP-Konzentration.
Pflügers Arch., 1969, 306, 329-340.
- 127 - EATON (J.W.), BREWER (G.J.), GROVER (R.F.)
Role of red cell 2,3 diphosphoglycerate in the adaptation of man to altitude.
J. Lab. clin. Med., 1969, 73, 603-609.
- 128 - EATON (J.W.), BREWER (G.J.), TASHIAN (R.T.)
Hexokinase isozyme patterns of human erythrocytes and leukocytes.
Nature, 1966, 212, 944.
- 129 - EIFLER (R.), WAGENKNECHT (C.)
NADH und NADPH spezifische GSSG-Reduktasen in roten Blutzellen.
Acta Biol. Med. German., 1964, 13, 674.
- 130 - ENG (L.T.L.), LOPEZ (C.G.), GIOK (P.O.H.)
Erythrocyte and leukocyte phosphoglucomutase in chinese.
Amer. J. Hum. Genet., 1968, 20, 101.
- 131 - ESSELBORN (H.)
Bestimmung und charakterisierung von zwei verschiedenen Magnesiumismen - anhängigen Adenosintriphosphatasen der menschlichen Blutzellen mittels einer neuen spezifischen Methode.
Inaugural Dissertation Medizin, Tübingen 1965
- 132 - FERNANDEZ (M.N.), FAIRBANKS (V.F.)
G.6PD deficiency in the Philippines. Report of a new variant : G.6PD pancy.
Mays clin. Proc., 1968, 43, 645-660.
- 133 - FAIRBANKS (V.F.), BEUTLER (E.)
A simple method for detection of erythrocyte G.6PD deficiency (G.6PD Spot test)
Blood, 1962, 20, 591-601.

- 134 - FAIRBANKS (V.F.), FERNANDEZ (M.N.)
The identification of metabolic errors associated with hemolytic anemia.
J.A.M.A., 1969, 208, 316-320.
- 135 - FELLEBERG (R.V.), RICHTERICH (R.), AEBI (H.)
Elektrophoretisch verschieden wandernde Pyruvatkinasen aus einigen organen der Ratte.
Enzymol. biol. clin., 1963, 3, 240.
- 136 - FESSAS (P.), DOXIADIS (S.A.), VALAES (T.)
Neonatal jaundice in G.6PD deficient infants.
Brit. Med. J., 1962, 2, 1359.
- 137 - FIALKOW (P.J.), BROWDER (J.A.), SPARKES (R.S.), MOTULSKY (A.)
Mental retardation in methemoglobinemia due to diaphorase deficiency.
New Engl. J. Med., 1965, 273, 840.
- 138 - FITCH (L.I.), PARR (C.W.), WELCH (S.G.)
Phosphoglucose isomerase variation in man.
Biochem. J., 1968, 110, 56.
- 139 - FLOHE (L.)
Spezifischer Nachweis der Glutathion-peroxydase auf Cellogel-Elektrophoresestreifen und Bestimmung des isoelektrischen Punktes.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1969, 350, 856-858.
- 140 - FLOHE (L.), BRAND (I.)
Kinetics of glutathione peroxidase.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 191, 541-549.
- 141 - FOREST (P.B.), KEMP (R.G.)
Alteration of the allosteric properties of phosphofructokinase by modification of a single thiol group.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1968, 33, 763.
- 142 - FRASER (G.R.), STAMATOYANNOPOULOS (G.), KATTAMIS (C.), LOUKOPOULOS (D.), DEFARANAS (B.), KITSOS (C.), ZANNOS-MARIOLEA (L.), CHOREMIS (C.), FESSAS (P.), MOTULSKY (A.G.)
Thalassemias, abnormal hemoglobins and G.6PD deficiency in the Arta area of Greece : diagnostic and genetic aspects of complete village studies.
Ann. Aca. Sci., N.Y., 1964, 119, 415-435.
- 143 - GABBURRO (D.), VOLPATO (S.), GIAQUINTO (M.)
Ictère nucléaire du nouveau-né par défaut de la G.6PD.
Ann. Pédiat., 1961, 37, 373.

- 144 - GABBURRO (D.), VOLPATO (S.), SCARPA (P.)
Pathologie érythrocytaire néo-natale par défaut en G.6PD.
Ann. Pédiat., 1962, 38, 625.
- 145 - GABRIO (B.W.), HENNESSEY (M.), THOMASSON (J.), FINCH (C.A.)
Erythrocyte preservation. IV - In vitro reversibility of the storage lesion.
J. Biol. Chem., 1955, 215, 357.
- 146 - GALTON (D.J.), JONES (A.E.)
Electrophoresis of human hexokinase in acrylamide gel.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1967, 126, 479-481.
- 147 - GARBY (L.), GERBER (G.), VERDIER (C.H. de)
Binding of 2,3 diphosphoglycerate and adenosine triphosphate to human haemoglobin A.
Europ. J. Biochem., 1969, 10, 110-115.
- 148 - GARTLER (S.M.), GANDINI (E.), CEPPELLINI (R.)
G.6PD deficient mutant in human cell culture.
Nature, 1962, 199, 602.
- 149 - GIBSON (Q.H.)
The reduction of methemoglobin in red cells and studies on the cause of idiopathie methemoglobinemia.
Biochem. J., 1948, 42, 13.
- 150 - GIGLIANI (F.), DI CORI (L.), ULIZZI (L.), REYNAUD (G.), BOTTINI (E.)
Frequenze geniche degli alleli al locus PGM3 per la fosfoglucomutasi in un campione della popolazione di Roma.
Atti Ass. Genet. Ital., 1969, 14, 102.
- 151 - GITZELMAN (R.)
Deficiency of erythrocyte galactokinase in a patient with galactose diabetes.
Lancet, 1965, 2, 670.
- 152 - GITZELMAN (R.)
Hereditary galactokinase deficiency, a newly recognised cause of juvenile cataracts.
Pediat. Res., 1967, 1, 14-23.
- 153 - GITZELMAN (R.)
Formation of Gal-1-P from UDPG in erythrocytes from patients with galactosemia.
Pediat. Res., 1969, 3, 279-286.
- 154 - GITZELMAN (R.)
Communication personnelle.

- 155 - GITZELMAN (R.), CURTIUS (H.C.), MULLER (M.)
Galactitol excretion in the urine of a galactokinase deficient man.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1966, 22, 437-441.
- 156 - GLATZLE (D.)
Enzymatic test for the detection of a riboflavin deficiency-NADPH-dependent glutathione reductase of red blood cells and its activation by FAD in vitro.
Experientia, 1968, 24, 1122.
- 157 - GREENWALD (I.)
A new type of phosphoric acid compound isolated from blood, with some remarks on the effect of substitution on the rotation of L-glyceric acid.
J. Biol. Chem., 1925, 63, 339.
- 158 - GREENBERG (L.H.), TANAKA (K.R.)
Hereditary elliptocytosis with hemolytic anemia. A family study of five affected members.
California Medicine, 1969, 110, 389-393.
- 159 - GRIFFITHS (P.D.)
The activity of ATP : creatine phosphotransferase (E.C.2.7.3.2.) in umbilical cord blood.
Clin. Chim. Acta, 1968, 20, 465.
- 160 - GROSCHEL - STEWART (U.)
Demonstration of two ATPases in human erythrocytes membranes.
Experientia, 1969, 25, 601-602.
- 161 - GROSS (R.T.), HURWITZ (R.E.)
The pentose phosphate pathway in human erythrocytes ; relationship between the age of the subject and enzyme activity.
Pediatrics, 1958, 22, 453.
- 162 - GROSS (R.T.), SCHROEDER (A.R.), BROUNSTEIN (S.A.)
Energy metabolism in the erythrocytes of premature infants compared to full term newborn infants cord adults.
Blood, 1963, 21, 755.
- 163 - HALL (B.), DAHLQUIST (A.)
Galactose-1-phosphate-uridyl-transferase activity in blood in translocation Down's syndrome.
Lancet, 1969, 1, 907.
- 164 - HANES (T.E.), PATTERSON (J.), Van EYS (J.)
Red cell aldolase and other enzyme activities in hereditary spherocytosis.
J. Lab. clin. Med., 1970, 75, 654.

- 165 - HANSEN (R.G.)
Hereditary galactosemia.
J.A.M.A., 1969, 208, 11.
- 166 - HARRIS (E.J.)
The influence of the metabolism of human erythrocytes of their potassium content.
J. Biol. chem., 1951, 141, 579-595.
- 167 - HARTLEYB (H.), FISCHER (D.), HEIDT (F.), LOHR (G.W.), LAUSECKER (C.)
Un nouveau cas de méthémoglobinémie congénitale récessive liée à un déficit en diaphorase I.
Arch. fr. Pédiat., 1964, 21, 1197-1204.
- 168 - HARVALD (B.), HANEL (K.H.), SQUIRES (R.), TRAP-JENSEN (J.)
Adenosine-triphosphatase deficiency in patients with non spherocytic haemolytic anemia.
Lancet, 1964, 2, 18-19.
- 169 - HATZFELD (A.), SCHAPIRA (F.)
Présence de deux types d'aldolase dans le globule rouge de lapin.
C.R. Acad. Sci. Paris, 1969, 269, 1799-1801.
- 170 - HEINRICH (M.R.)
The purification and properties of yeast galactokinase.
J. Biol. Chem., 1964, 239, 50-53.
- 171 - HENNEMAN (H.H.), ESSERS (U.), STECHER (G.)
Chronischer nicht-sphärocytärer Hämolytischer Ikterus bei völligen Fehler der G.6PD dehydrogenase Aktivität der Erythrocyten.
Klin. Wschr., 1964, 42, 1250.
- 172 - HERBICH (J.), PESENDORFER (F.)
Anwendung des Enzymsystems der Erythrocyten-Phosphoglukomutase bei der Vaterschaftsbegutachtung.
Wien. Klin. Woch., 1969, 38, 661-667.
- 173 - HOLMES (E.W.), MALONE (J.I.), WINEGRAD (A.I.), OSKI (F.A.)
Hexokinase isoenzymes in human erythrocytes : association of type II with fetal hemoglobin.
Science, 1967, 156, 646-648.
- 174 - HOLMSEN (H.), STORM (E.)
The adenosine triphosphate inhibition of the pyruvate kinase reaction and its dependance on the total magnesium ion concentration.
Biochem. J., 1969, 112, 303-316.

- 175 - HOOK (E.B.), STAMATOYANNOPOULOS (G.), YOSHIDA (A.),
G.6PD madrona : a slow electrophoretic G.6PD variant with
kinetic characteristics similar to those of normal type.
J. Lab. Clin. Med., 1968, 72, 404-409;
- 176 - HOPKINSON (D.A.), HARRIS (H.)
Evidence for a second "structural" locus determining human
phosphoglucomutase.
Nature, 1965, 208, 410-412.
- 177 - HOPKINSON (D.A.), HARRIS (H.)
A third phosphoglucomutase locus in man.
Ann. Hum. Genet., 1968, 31, 359-367.
- 178 - HOPKINSON (D.A.), LEWIS (W.H.P.)
An automated method for the determination of phosphogluco-
mutase activity.
Technicon Symposium, 1967, 227-231.
- 179 - HORECKER (B.L.), SMYRNIOTIS (P.Z.), SEEGMILLER (J.E.)
The enzymic conversion of 6-phosphogluconate to ribulose-
5-P and ribose 5-P
J. Biol. chem., 1951, 193, 383. .
- 180 - HORN (H.D.)
Heparin-determination with pyruvate kinase in methods of enzy-
matic analysis.
Academic Press.
- 181 - HUANG (Y.L.), EBNER (K.E.)
Inhibition of phosphoglucomutase by galactose 1,6-diphosphate.
Experientia, 1969, 25, 917-918.
- 182 - HUENNEKENS (F.M.), KERWAR (G.K.), KAJITA (A.)
Methemoglobin reductase.
in Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism
Beutler E. Ed., Grune and Stratton, NY 1968
- 183 - ICEN (A.)
Glutathione reductase of human erythrocytes. Purification and
properties.
Scand. J. Lab. Clin. Invest., 1967, 96, Suppl.1
- 184 - INGRAM (J.M.)
Fructose diphosphate aldolase of yeast : studies on the sul-
fhydryl groups.
Canad. J. Biochem., 1969, 47, 595.
- 185 - ISHOMOTO (G.), YADA (S.)
Frequency of red cell phosphoglucomutase phenotypes in the Ja-
panese population.
Hum. Heredity, 1969, 15, 198-202.

- 186 - JACKSON (R.C.)
Studies in the enzymology of glutathion metabolism in human erythrocytes.
Biochem. J., 1969, 111, 309-315.
- 187 - JACOBS (M.S.), JANDL (J.H.)
Effects of sulfhydryl inhibition on red cells. II. Studies in vivo.
J. Clin. Invest., 1960, 39, 1818.
- 188 - JACOBS (A.I.), CAVILL (A.J.), HUGHES (J.N.)
Erythrocyte transaminase activity. Effect of age, sex and vitamine B6 supplementation.
Amer. J. Clin. Nutr., 1968, 21, 502.
- 189 - JAFFE (E.R.)
Metabolic processes involved in the formation and reduction of methemoglobin in human erythrocytes.
in The red blood cell - Academic Press Ed., N.Y. 1963
- 190 - JOSHI (M.D.), JAGANNATHAN (V.)
Properties and kinetics of purified brain hexokinase.
Arch. Biochem. Biophys., 1968, 125, 460-467.
- 191 - KAJITA (A.), KERWAR (J.K.), HUENNEKENS (F.M.)
Multiple forms of methemoglobin reductase.
Arch. Biochem. Biophys., 1969, 130, 662-673.
- 192 - KALCKAR (H.M.), ANDERSON (E.P.), ISSELBACHER (K.J.)
Galactosemia, a congenital defect in a nucleotide transferase.
Biochim. Biophys. Acta, 1956, 20, 262-268.
- 193 - KANAZAWA (Y.)
The relationship of NADH-dependent diaphorase activity and methemoglobin reduction in human erythrocytes.
Clin. Chim. Acta, 1968, 19, 523.
- 194 - KAPLAN (J.C.)
Electrophoretic study of glutathione reductase in human erythrocytes and leucocytes.
Nature, 1968, 217, 256-258.
- 195 - KAPLAN (J.C.)
Diaphorases et glutathion réductase érythrocytaires.
in Exposés Annuels de Biochimie Médicale, 29e série
Masson Ed., Paris 1969

- 196 - KAPLAN (J.C.), BEUTLER (E.)
Electrophoresis of red cell NADH and NADPH diaphorases in normal subjects and patients with congenital methemoglobinemia.
Bioch. Biophys. Res. Comm., 1967, 29, 605-610.
- 197 - KAPLAN (J.C.), BEUTLER (E.)
Hexokinase isoenzymes in human erythrocytes.
Science, 1968, 159, 215-216.
- 198 - KAPLAN (J.C.), DREYFUS (J.C.), BESSIS (M.)
La structure en mosaïque du chromosome X chez la femme. Essai de démonstration microspectrophotométrique d'une double population de globules rouges chez les femmes hétérozygotes pour le déficit en G.6PD.
Nouv. Rev. fr. Hémat., 1965, 5, 835.
- 199 - KAPLAN (J.C.), SHORE (N.), BEUTLER (E.)
The rapid detection of triose phosphate isomerase deficiency.
Amer. J. Clin. Path., 1968, 50, 656-658.
- 200 - KAPLAN (J.C.), TEEPLE (L.), SHORE (N.), BEUTLER (E.)
Electrophoretic abnormality in triosephosphate isomerase deficiency.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1968, 31, 768-773.
- 201 - KARPATKIN (S.)
Interconvertible molecular forms of soluble hexokinase in frog skeletal muscle.
J. Biol. Chem., 1968, 243, 3841-3848.
- 202 - KEITT (A.S.)
Hemolytic anemia with impaired hexokinase activity.
J. clin. Invest., 1969, 48, 1997-2007.
- 203 - KELLERMEYER (R.W.), TARLOV (A.R.), SCHRIER (S.L.), CARLON (P.E.), ALVING (A.S.)
The hemolytic effect of primaquine. XIII Gradient susceptibility to hemolysis of primaquine sensitive erythrocytes.
J. Lab. Clin. Med., 1961, 58, 225.
- 204 - KERR (C.B.)
X-linked haematological traits.
Proc. 11th Congr. int. Soc. Blood Transf., Sydney 1966,
Bibl. Haemat., 29, 59 - Karger Ed. Basel, 1968
- 205 - KING (M.J.), GILLIS (E.M.), BAIKIE (A.G.)
Alkaline-phosphatase activity of polymorphs in mongolism.
Lancet, 1962, 2, 1302.

- 206 - KIRKMAN (H.N.)
G.6PD from human erythrocytes.I. Further purification and characterization.
J. Biol. Chem., 1962, 237, 2364.
- 207 - KIRKMAN (H.N.), KIDSON (C.), KENNEDY (M.)
Variants of human G.6PD - Studies of samples from New Guinea.
in Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism,
Beutler E., Ed., Grune and Stratton, N.Y. 1968
- 208 - KIRKMAN (H.N.), MAXWELL (E.S.)
Enzymatic estimation of erythrocyte galactose-1-phosphate.
J. Lab. Clin. Med., 1960, 64, 161-166.
- 209 - KIRKMAN (H.N.), RILEY (H.D.)
Congenital nonspherocytic hemolytic anemia.
Am. J. Dis. Child., 1961, 102, 313-319.
- 210 - KOLER (R.), BIGLEY (R.), JONES (R.J.), RIGAS (D.A.), VAN BELLINGHEN (P.), THOMPSON (P.)
Pyruvatekinase : molecular differences between human red cell and leucocyte enzyme.
Cold Spring Harbor Symposia on quantitative Biology, 1964, 29, 213.
- 211 - KOPPERSCHLAGER (G.), HOFMANN (E.)
Über multiple formen der Hexokinase in Hefe.
Europ. J. Biochem., 1969, 9, 419-423.
- 212 - KRAUS (A.P.), LANGSTON (M.F.), LYNCH (B.L.)
Red cell phosphoglyceratekinase deficiency : a new cause of non spherocytic hemolytic anemia.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1968, 30, 173.
- 213 - KRAUS (A.P.), NEELY (C.L.)
Human erythrocyte lactate dehydrogenase : four genetically determined variants.
Science, 1964, 145, 595.
- 214 - KRZANOWSKI (J.), MATSCHINSKY (F.M.)
Regulation of phosphofructokinase by phosphocreatine and phosphorylated glycolytic intermediates.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1969, 34, 816-823.
- 215 - KUBLER (W.)
Clinical and biochemical studies of two patients with deficiency of glutathione reductase and defective heme synthesis in the red cells.
Arch. Klin. Med., 1968, 215, 67.

- 216 - KUHN (B.), JACOBASCH (G.), RAPOPORT (S.)
Einige Eigenschaften der Phosphofruktokinase von Rattenerythrozyten.
Acta biol. Med. germ., 1969, 23, 1-17.
- 217 - LABIE (D.), LEROUX (J.P.), NAJMAN (A.), REYROLLE (C.)
Déficit familial en diphosphoglycératemutase. Retentissement sur l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène.
Ann. Biol. clin. (à paraître)
- 218 - LABRUNE (B.), CARTIER (P.), BONNENFANT (F.), RIBIERRE (M.), MALLET (R.)
Encephalopathie familiale avec hyperuricémie.
Arch. fr. Pédiat., 1969, 26, 139-154.
- 219 - LAI (H.C.), LAI (M.P.Y.), LEUNG (K.S.N.)
G.6PD deficiency in Chinese.
J. Clin. Path., 1968, 21, 44.
- 220 - LAMM (L.U.)
Red cell phosphoglucomutase and acid phosphatase types among Danish blood donors.
Acta Genet., 1968, 18, 386-393.
- 221 - LAMY (M.), FREZAL (J.), JAMMET (M.L.)
La méthémoglobinémie congénitale récessive.
Nouv. Rev. fr. Hémat., 1963, 3, 105-120.
- 222 - LAURENT (C.), MICHEL (M.), PHILIPPE (N.), PINÇON (J.A.)
Délétion du bras court du chromosome 18 et mosaïque paternelle.
Ann. Genet., 1970, 13, 56.
- 223 - LAUSECKER (C.H.), HEIDT (P.), FISCHER (D.), HARTLEYB (M.), LOHR (G.W.)
Anémie hémolytique constitutionnelle avec déficit en 6-phosphogluconate deshydrogénase. Un nouveau type d'anémie avec carence enzymatique intra-érythrocytaire.
Arch. fr. Pédiat., 1965, 22, 789.
- 224 - LAYZER (R.B.), LEWIS (P.R.), BANK (W.J.)
Physical and kinetic properties of human phosphofructokinase from skeletal muscle and erythrocytes.
J. Biol. chem., 1969, 244, 3823.
- 225 - LAYZER (R.B.), ROWLAND (L.P.), BANK (W.J.)
Physical and kinetic properties of human phosphofructokinase from skeletal muscle and erythrocytes.
J. Biol. chem., 1969, 244, 3823-3831.

- 226 - LAZARD (G.)
Etude de quelques enzymopathies érythrocytaires : à propos de sept cas étudiés en Alsace.
Thèse Pharmacie, Strasbourg 1969
- 227 - LELOIR (L.F.)
The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivate.
Arch. Biochem., 1951, 33, 186-190.
- 228 - LEROUX (J.P.)
Les nucléotides du globule rouge humain.
Thèse Med., Paris 1962
- 229 - LEROUX (J.P.)
Communication personnelle.
- 230 - LESTRADET (H.), GENTIL (M.), PROCHOROW (M.), TICHET (J.)
Etude de l'utilisation du galactose injecté par voie veineuse chez les prématurés, les nouveaux-nés et les jeunes enfants.
Arch. fr. Pédiat., 1969, 26, 621-631.
- 231 - LEWANDOWSKI (J.), DUDA (W.), FABJANOWSKA (Z.), LEYKO (W.)
Erythrocyte metabolism of umbilical cord blood and venous blood during delivery.
Clin. Chim. Acta, 1968, 21, 175.
- 232 - LODER (P.B.), BABARCZY (G.), GRUCHY (G.C. de)
Red cell metabolism in hereditary spherocytosis.
Brit. J. Haemat., 1967, 13, 95.
- 233 - LOHR (G.W.), WALLER (H.D.)
Zellstoffwechsel und Zellasterung.
Klin. Wschr., 1959, 37, 833.
- 234 - LOHR (G.W.), WALLER (H.D.)
Biochemie und Pathogenese der enzymopatischen Anämien.
Dtsch. Med. Wschr., 1961, 86, 27.
- 235 - LOHR (G.W.), WALLER (H.D.)
Zur biochemie einer angehorenen hämolytische Anämie.
Folia Haemat., 1963, 8, 377.
- 236 - LOHR (G.W.), WALLER (H.D.)
Hamolytische Erythrocytopathie durch Fehler von G.6PD in roten Blutzellen als dominant vererbliche Krankheit.
Klin. Wschr., 1958, 36, 865.

- 237 - LOHR (G.W.), WALLER (H.D.)
Eine neue enzymopenische hämolytische Anämie mit Glutathion
Reduktase-Mangel.
Med. Klin., 1962, 57, 1521.
- 238 - LOHR (G.W.), WALLER (H.D.), ANSCHUTZ (F.), KNOPP (A.)
Biochemische Defekte in den Blutzellen bei familiärer Pan-
myelopathie (Typ Fanconi).
Humangenetik, 1965, 1, 383-387.
- 239 - LOHR (G.W.), WALLER (H.D.), ZYSNO (E.), GEROK (W.), VOSS (D.),
STRAUSS (G.)
Glutathionreduktase Mangel mit hämatologischen und neurolo-
gischen Störungen.
Klin. Wschr., 1965, 43, 413.
- 240 - LOWY (B.A.), RAMOT (B.), LONDON (I.M.)
The biosynthesis of adenosine triphosphate and guanosine tri-
phosphate in the rabbit erythrocyte in vivo and in vitro.
J. Biol. chem., 1960, 235, 2920.
- 241 - LOWY (B.A.), WILLIAMS (M.K.), LONDON (I.M.)
Enzymatic deficiencies of purine nucleotide synthesis in the
human erythrocytes.
J. Biol. Chem., 1962, 237, 1622.
- 242 - LYON (M.P.)
Gene action in the X chromosome of mouse (*mus musculus* L.)
Nature, 1961, 190, 372.
- 243 - Mac DONALD (C.D.), HUISMAN (T.H.J.)
A comparative study of enzymic activities in normal adult and
cord blood erythrocytes as related to the reduction of methemoglobin.
Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 555.
- 244 - MADEC (Y.)
Contribution à l'étude des activités enzymatiques dans l'ex-
ploration fonctionnelle du globule rouge.
Thèse Med., Nantes 1966
- 245 - MALLARME (J.), BOIVIN (P.), GERBAUX (J.)
L'anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire par défi-
cit en pyruvate kinase.
Bull. Soc. Med. Hôp. Paris, 1964, 115, 483.
- 246 - MALONE (J.I.), WINEGRAD (A.I.), OSKI (F.A.), HOLMES (E.W.)
Erythrocyte hexokinase isoenzyme patterns in hereditary hemo-
globinopathies.
New Engl. J. Med., 1968, 279, 1071-1077.

- 247 - MARCHESI (V.T.), PALADE (G.E.)
The localization of Mg-Na-K activated adenosine triphosphatase on red cell short membranes.
J. Cell. Biol., 1967, 35, 385.
- 248 - MARKS (P.A.)
Aspects biochimiques du vieillissement du globule rouge et de l'anémie hémolytique d'origine médicamenteuse.
Nouv.Rev. fr. Hémat., 1961, 1, 900.
- 249 - MARKS (P.A.)
G.6PD reaction and the pentose phosphate pathway.
in The red blood cell, Academic Press Ed., N.Y. 1964
- 250 - MARKS (P.A.), GROSS (R.T.)
Erythrocyte G.6PD deficiency : evidence of difference between Negroes and Caucasians with respect to this genetically determined trait.
J. Clin. Invest., 1959, 38, 2253.
- 251 - MASIAR (S.J.), GREEN (J.W.)
Relationship of Na⁺, K⁺ and Mg⁺⁺ - ATP bindings sites for the human erythrocyte stromal (Na⁺ - K⁺) dependent ATPase.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 159, 340.
- 252 - MASSEY (V.), WILLIAMS (C.H.)
On the reaction mechanism of yeast glutathione reductase.
J. Biol. Chem., 1965, 240, 4470;
- 253 - MATHAI (C.K.), BEUTLER (E.)
Electrophoretic variation of galactose-1-phosphate uridyl-transferase.
Science, 1966, 154, 1179.
- 254 - MATHAI (C.K.), BEUTLER (E.)
Biochemical characteristics of galactokinase from adult and fetal human red cells.
Enzymologia, 1967, 33, 224-230.
- 255 - MATSUI (H.), SCHWARTZ (A.)
Mechanism of cardiac glycoside inhibition of the (Na⁺ K⁺) dependent ATPase from cardiac tissue.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 151, 655.
- 256 - MAXWELL (E.S.), KURAHASHI (K.), KALCKAR (H.M.)
Enzymes of the Leloir pathway.
in Methods of Enzymology, 1962, 5, 174-176

- 257 - MAYES (J.S.), GUTHRIE (R.)
Detection of heterozygotes for galactokinase deficiency in a human population.
Biochem. Genetics, 1968, 2, 219-230.
- 258 - MELLMAN (W.J.), OSKI (F.A.), TEDESCO (T.A.), MACIERA-COELHO (A.), HARRIS (H.)
Leucocyte enzymes in Down's syndrome.
Lancet, 1964, 1, 674.
- 259 - MELLMAN (W.J.), TEDESCO (T.A.)
An improved assay of erythrocyte and leukocyte galactose-1-phosphate uridyl transferase : stabilization of the enzymes by a thiol protective reagent.
J. Lab. Clin. Med., 1965, 66, 980-986.
- 260 - MESSERSCHMITT (J.), SUAUDEAU (C.), BENALLEGUE (A.), VENEZIA (R.), FABRE (S.), BON (J.), ANDRE (L.), KHATI (B.), DUBOIS (M.), BENABDALLAH (S.), KOTCHOYAN (P.)
Défaut en G.6PD au cours des anémies hémolytiques en Algérie.
Nouv. Rev. fr. Hémat., 1967, 7, 827.
- 261 - MILLS (G.C.)
The purification and properties of glutathione peroxylase of erythrocytes.
J. Biol. Chem., 1959, 234, 502.
- 262 - MIRCEVOVA (L.), BRABEC (V.), PALEK (J.)
Adenosine triphosphatase activity in hereditary spherocytosis.
Blut, 1967, 15, 149.
- 263 - MOHLER (D.N.), CROCKETT (C.L.)
Hereditary hemolytic disease secondary to G.6PD deficiency : report of three cases with special emphasis on ATP metabolism.
Blood, 1964, 23, 427.
- 264 - MONN (E.)
Red cell phosphoglucomutase types of norwegian lapps-characteristic gene frequencies and variant types.
Human Heredity, 1969, 19, 274.
- 265 - MONN (E.)
Application of the phosphoglucomutase system of human red cells in paternity cases.
Vox Sang., 1969, 16, 211-221.
- 266 - MOORE (C.L.)
Purification and properties of two hexokinases from beef brain.
Arch. Biochem. Biophys., 1968, 128, 734-744.

- 267 - MOSER (K.), FISCHER (M.), KREPLER (P.), LECHNER (K.)
Glutathionreductase und triosephosphatisomerasemangel in
Erythrocyten und thrombocyten bei Pancytopenie.
Klin. Woch., 1968, 46, 995.
- 268 - MULLER (J.), HURAWSKI (K.), SZYMANOVSKA (Z.), KOZIOROWSKI (A.)
Hereditary deficiency of NADPH methemoglobin reductase.
Acta Med. Scand., 1963, 173, 243-247.
- 269 - NADLER (H.L.), INOUE (T.), HSIA (D.Y.Y.)
Enzymes in trisomy 18 syndrome.
Lancet, 1966, 2, 1270.
- 270 - NECHELES (T.F.), BOLES (T.A.), ALLEN (D.M.)
Erythrocyte glutathione-peroxidase deficiency and hemolytic
disease of the newborn infant.
Pediatrics, 1968, 72, 319.
- 271 - NECHELES (T.F.), MALDONADO (N.), BARQUET-CHEDIAK (A.), ALLEN (D.M.)
Homozygous erythrocyte glutathione-peroxidase deficiency :
clinical and biochemical studies.
Blood, 1969, 33, 164-169.
- 272 - NEIMANN (N.), PIERSON (M.), MANCIAUX (M.), VERT (P.), DUCAS (J.)
Méthémoglobinémies congénitales.
Med. inf., 1965, 72, 93-103.
- 273 - NEWSHOLME (E.A.), ROBINSON (J.), TAYLOR (K.)
A radiochemical enzymatic activity assay for glycerolkinase
and hexokinase.
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 132, 338-346.
- 274 - NG (W.G.), BERGREN (W.R.), FIELDS (M.), DONNELL (G.N.)
An improved electrophoretic procedure for galactose-1-phosphate
uridyl-transferase : demonstration of multiple activity bands
with the Duarte variant.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1969, 37, 354-362.
- 275 - NG (W.G.), DONNELL (G.N.), BERGREN (W.R.)
Galactokinase activity in human erythrocytes of individuals
at different ages.
J. Lab. Clin. Med., 1965, 66, 115-121.
- 276 - NILSSON (O.), RONQUIST (G.)
Enzyme activities and ultrastructure of a membrane fraction
from human erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 183, 1-9

- 277 - NISHIMURA (E.), TAKAHARA (S.), HOKAMA (Y.)
Interrelationship of catalase and C-reactive protein in
Acatalasemic erythrocytes.
Arch. Biochem. Biophys., 1968, 126, 121-130.
- 278 - Normalisation des techniques d'étude de la glucose-6-phosphate
deshydrogénase
Org. Mond. Santé Sér. Rapp. Techn., 1967, 366.
- 279 - ODEIDE (R.), GUILLOTON (M.), DUPUIS (B.), ROSENBERG (A.J.)
Etude d'une enzyme allostérique à deux substrats : la phos-
phofructokinase du muscle de rat.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 2023-2052.
- 280 - OLSEN (J.E.)
Neonatal nonspherocytic hemolytic anemia due to G.6PD defi-
ciency in a Danish infant.
Acta Paediat. Scand., 1969, 58, 187-190.
- 281 - OMACHI (A.), SCOTT (C.B.), PARRY (T.E.)
Influence of glycolysis of NADH content in human erythrocytes.
Amer. J. Physiol., 1969, 216, 527-530.
- 282 - OORT (M.), LOOS (J.A.), PRINS (H.K.)
Hereditary absence of reduced glutathione in the erythrocytes :
a new clinical and biochemical entity ?
Vox Sang., 1961, 6, 370.
- 283 - OSKI (F.A.)
The metabolism of erythrocytes and its relation to hemolytic
anemias in the newborn.
Pediat. clin. N. Amer., 1965, 12, 687.
- 284 - OSKI (F.A.)
Red cell metabolism in the newborn infant. V. Glycolytic in-
termediate and glucolytic enzymes.
Pediatrics, 1969, 44, 84.
- 285 - OSKI (F.A.), BOWMAN (H.)
A low Km phosphoenolpyruvate mutant in the amish with red cell
pyruvate kinase deficiency.
Brit. J. Haemat., 1969, 17, 289-298.
- 286 - OSKI (F.A.), DIAMOND (L.K.)
Erythrocyte pyruvate kinase deficiency resulting in congeni-
tal non spherocytic hemolytic anemia.
New Engl. J. Med., 1963, 269, 763.

- 287 - OSKI (F.A.), GOTTLIEB (A.J.), DELIVARIA-PAPADOPOULOS (M.),
MILLER (W.W.)
Red cell 2,3 diphosphoglycerate levels in subjects with
chronic hypoxemia.
New Engl. J. Med., 1969, 280, 1165-1166.
- 288 - OSZOYLU (S.)
Hereditary methemoglobinemic cyanosis due to diaphorase deficiency in three successive generations.
Acta Haemat., 1967, 37, 276-283.
- 289 - PAETKAU (V.H.), YOUNATHAN (E.S.), LARDY (H.A.)
Phosphofructokinase : studies on the subunit structure.
J. Mol. Biol., 1968, 33, 721-736.
- 290 - PAGLIA (D.E.), HOLLAND (P.), BAUGHAN (M.A.), VALENTINE (W.N.)
Occurrence of defective hexose phosphate isomerization in human erythrocytes and leukocytes.
New Engl. J. Med., 1969, 280, 66-71.
- 291 - PAGLIA (D.E.), VALENTINE (W.N.)
Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase.
J. Lab. clin. Med., 1967, 70, 158-169.
- 292 - PAGLIA (D.E.), VALENTINE (W.N.), BAUGHAN (M.A.), MILLER (D.R.),
REED (C.F.), Mc INTYRE (O.R.)
An inherited molecular lesion of erythrocyte pyruvate kinase. Identification of a Kinetically aberrant isozyme associated with premature hemolysis.
J. clin. Invest., 1968, 47, 1929.
- 293 - PANTEKALIS (S.N.), KARAKLIS (A.G.), ALEXIOU (D.), VARDAS (E.),
VALAES (T.)
Red cell enzymes in trisomy 21.
Amer. J. Hum. Genet., 1970, 22, 184-193.
- 294 - PARKER (J.C.)
Influence of 2,3 diphosphoglycerate metabolism on sodium-potassium permeability in human red blood cells : studies with bisulfite and other redox agents.
J. Clin. Invest., 1969, 48, 117-125.
- 295 - PARR (C.W.), FICH (L.I.)
Hereditary partial deficiency of human erythrocyte phosphogluconate dehydrogenase.
Biochem. J., 1964, 93, 280.

- 296 - PASSONEAU (J.V.), LOWRY (O.H.)
Phosphoglucumutase kinetics with the phosphates of fructose, glucose, mannose, ribose and galactose.
J. Biol. Chem., 1969, 244, 910-916.
- 297 - PASSONEAU (J.V.), LOWRY (O.H.), SCHULZ (D.W.), BROWN (J.G.)
Glucose 1,6-diphosphate formation by phosphoglucumutase in mammalian tissues.
J. Biol. Chem., 1969, 244, 902-909.
- 298 - PIETTE (M.)
Numération directe en cellule hémati métrique des réticulocytes du sang circulant.
Sang, 1960, 31, 265-272.
- 299 - PILKIS (S.J.)
Identification of human hepatic glucokinase and some properties of the enzyme.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1968, 129, 681-684.
- 300 - PINOT (C.), KAMOUN (P.), JEROME (H.)
Isolement des éléments figurés du sang. Application à un échantillon de 10 ml de sang humain.
Ann. Biol. clin., 1970, 28, 85-88.
- 301 - POLONOWSKI (M.)
Biochimie Médicale, II
Masson Ed. Paris, 1967
- 302 - PONDER (E.)
The cell membrane and its properties
in The cell, biochemistry, physiology, morphology
Brachet J., Mirsky A.E., Academic Press Ed., N.Y. 1961
- 303 - POST (R.L.), MERRITT (C.L.), KINSOLVING (C.R.), ALBRIGHT (C.D.)
Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte.
J. Biol. Chem., 1960, 235, 1796.
- 304 - PRAGER (M.D.), WHIGAM (W.R.)
Purification of human erythrocyte pyruvate kinase.
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 137, 181-184.
- 305 - PRANKERD (T.A.J.), BOWDLER (A.J.)
Studies in congenital non spherocytic haemolytic anemia with specific enzyme deficit.
Acta Haemat., 1964, 31, 65.

- 306 - PRINS (H.K.), OORT (M.), LOOS (J.A.), ZURCHER (C.), BECKERS (T.A.)
Hereditary absence of glutathione in the erythrocytes. Biochemical, haematological and genetical studies.
Proc. 9th Cong. Europ. Haemat., Lisbonne, 1963, Karger Ed. Basel
- 307 - RAMOT (B.), BEN BASSAT (I.), SCHORY (M.)
New G.6PD variants observed in Israel and their association with congenital nonspherocytic hemolytic disease.
J. Lab. Clin. Med., 1969, 74, 895-901.
- 308 - RAPOPORT (S.)
Regulation of metabolism in red cells.
Proc. 11th Cong. int. Soc. Blood Transf., Sydney 1966
Biblioth. Haemat., 29, Karger, Ed., Basel 1968
- 309 - RAPOPORT (S.), HINTERBERGER (U.), HOFFMANN (E.C.G.)
Die begrenzende Rolle der Hexokinase-Reaktion für die anaerobie glykolyse der Roten Blutzellen.
Naturwissenschaften, 1961, 48, 501.
- 310 - RAPOPORT (S.), LUEBERING (J.)
The formation of 2,3-diphosphoglycerate in rabbit erythrocytes. The existence of a diphosphoglycerate mutase.
J. Biol. Chem., 1950, 183, 507.
- 311 - RAPOPORT (S.), LUEBERING (J.)
An optical study of phosphoglycerate mutase.
J. Biol. Chem., 1952, 196, 583-588.
- 312 - RELANDER (A.)
Intravenous galactose tolerance test. Normal series of children.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1968, 22, 196-198.
- 313 - RENNINGER (W.), SPIELMANN (W.)
Beitrag zur Genetik der Erythrocyten-phosphoglucomutase.
Humangenetik, 1969, 8, 64-66.
- 314 - RENWICK (J.H.)
Progress in mapping human autosomes.
Br. Med. Bull., 1969, 25, 65.
- 315 - RIPPA (M.), SIGNORINI (M.), PONTREMOLI (E.)
6-phosphogluconate dehydrogenase : evidence for two identical polypeptide chains and two substrate binding sites.
Ital. J. Biochem., 1969, 18, 192.

- 316 - ROBINSON (A.)
The assay of galactokinase and galactose-1-phosphate uridyl transferase activity in human erythrocytes.
J. Exper. Med., 1963, 118, 359.
- 317 - RONQUIST (G.)
Enzyme activities at the surface of intact human erythrocytes.
Acta physiol. Scand., 1969, 76, 312-320.
- 318 - ROODYN (D.B.), MAROUDAS (N.G.)
Multiple enzyme analysis with computer processing of data.
Anal. Biochem., 1968, 24, 496-505.
- 319 - ROOS (F.), VIGNERON (C.), RIES-BOURGAUX (M.), STUDIEVIC (C.), SIEST (G.)
Analyse automatique de la créatine-phospho-kinase. Application à la chromatographie des isoenzymes tissulaires.
Ann. Biol. clin., 1969, 27, 201-214.
- 320 - ROPERS (H.), RITTER (H.)
Formal genetics of the 6.PGD polymorphism ; investigation of 220 families.
Humangenetik, 1969, 8, 69.
- 321 - ROSE (Z.B.)
The purification and properties of diphosphoglyceratemuase from human erythrocytes.
J. Biol. Chem., 1968, 243, 4810.
- 322 - ROSNER (F.), ONG (B.H.), PAINE (R.S.), MAHANAND (D.)
Biochemical differentiation of trisomic Down's syndrome (mongolism) from that due to translocation.
New Engl. J. Med., 1965, 273, 1356.
- 323 - ROSS (J.D.)
Deficient activity of DPNH dependent methemoglobin diaphorase in cord blood erythrocytes.
Blood, 1963, 21, 51.
- 324 - ROSS (J.D.), DESFORGES (J.F.)
Reduction of methemoglobin by erythrocytes cord blood.
Pediatrics, 1959, 21, 718.
- 325 - ROSTAND (J.)
Pensées d'un biologiste, 1954
Stock Ed. Paris
- 326 - ROTH (K.L.), FRUMIN (A.L.)
Studies on the hemolytic principle of the fava bean.
J. Lab. Clin. Invest., 1960, 56, 695.

- 327 - SABINE (J.C.), JUNG (E.D.), FISCH (M.B.), PESTANER (L.C.), RANKIN (R.E.)
Observations on the inheritance of G.6PD deficiency in erythrocytes and in leucocytes.
Brit. J. Haemat., 1963, 9, 164-171.
- 328 - SANSONE (G.), SEGNI (G.)
Nuovi aspetti dell'alterato biochimismo degli eritrociti di favici : assenza pressoché completa della G.6PD.
Bull. Soc. Ital. Biol. Sper., 1958, 15, 327.
- 329 - SASS (M.D.), CARUSO (C.J.), FAHRANGI (M.)
TPNH Methemoglobin reductase deficiency : a new red cell enzyme defect.
J. Lab. Clin. Med., 1967, 69, 447.
- 330 - SATO (S.), MATSUSHIMA (T.), SUGIMURA (T.)
Hexokinase isozyme patterns of experimental hepatomas of rats.
Cancer Res., 1969, 29, 1437-1446.
- 331 - SCHAPIRA (F.)
Galactose-1-phospho-uridyl transferase des éléments figurés du sang.
in Exposés Annuels de Biochimie Médicale, 29e série
Masson Ed. Paris, 1969
- 332 - SCHAPIRA (F.), KAPLAN (J.C.)
Electrophoretic abnormality of galactose-1-phosphate uridyl transferase in galactosemia.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1969, 35, 451-455.
- 333 - SCHAPIRA (F.), NORDMANN (Y.)
Présence de trois types d'aldolase dans le foie humain.
Clin. Chim. Acta, 1969, 26, 189.
- 334 - SCHAPIRA (F.), ROSA (J.)
Les isozymes de la lactico-deshydrogénase du globule rouge.
Nouv. Rev. fr. Hémat., 1967, 7, 109-114.
- 335 - SCHMIZU (E.), MATSUURA (F.)
Purification and some properties of methemoglobin reductase.
Agric. Biol. Chem., 1968, 32, 587.
- 336 - SCHNEIDER (A.S.), DUNN (I.), IBSEN (K.H.), WEINSTEIN (M.)
Pattern of glycolysis in erythrocyte triose phosphate isomerase deficiency.
Clin. Res., 1965, 13, 382.

- 337 - SCHNEIDER (A.S.), DUNN (I.), IBSEN (K.H.), WEINSTEIN (I.M.)
 Triose-phosphate-isomerase deficiency - clinical and genetic aspects
 in Hereditary disorders of erythrocyte metabolism.
 City of Hope Symposium series, vol. 1 - Beutler E.
 Grune and Stratton, Ed. N.Y. 1968
- 338 - SCHNEIDER (A.S.), VALENTINE (W.N.), HATTORI (M.), HEINS (H.L.)
 Hereditary hemolytic anemia with triosephosphate isomerase deficiency.
New Engl. J. Med., 1965, 272, 229-235.
- 339 - SCHROTER (W.)
 Kongenitale nichtsphärocytäre hämolytische Anämie bei
 2,3 diphosphoglyceratemetase Mangel der Erythrocyten in
 grünen Säuglingsalter.
Klin. Wschr., 1965, 43, 1147.
- 340 - SCHROTER (W.)
 Kinetic des 2,3-diphosphoglyceratemetasatzes in menschlichen
 erythrocyten.
Biochem. Z., 1965, 341, 387.
- 341 - SCHROTER (W.), KALINOWSKY (W.)
 Erythrocyte 2,3-diphosphoglyceratemetase : an optical test
 in hemolysates.
Clin. Chim. Acta, 1969, 25, 283-285.
- 342 - SCHROTER (W.), TILLMANN (W.)
 Hexokinase isoenzymes in human erythrocytes of adults and
 newborns.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1968, 31, 92-97.
- 343 - SCHWARTZ (M.K.), BODANSKY (O.)
 Automation of methods for the study of enzyme kinetics.
 Technicon Symposium 1966
- 344 - SCHWARZ (V.), HOLZEL (A.), KOMROWER (G.M.)
 Laboratory diagnosis of congenital galactosemia at birth.
The Lancet, 1958, 1, 24-25.
- 345 - SCHWEIKHARDT (F.), HESSING (J.)
 Vergleichende Enzymuntersuchungen in Serum, in Erythrocyten
 und in Leukocyten von schwachsinnigen Aultaltspatienten.
Humangenetik, 1969, 7, 203.
- 346 - SCIALOM (C.), NAJEAN (Y.), BERNARD (J.)
 Anémie hémolytique congénitale non sphérocytaire avec déficit
 incomplet en 6-phosphogluconate deshydrogénase.
Nouv. Rev. fr. Hémat., 1966, 6, 452.

- 347 - SCOTT (E.M.)
The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia.
J. Clin. Invest., 1960, 2, 1176-1179.
- 348 - SCOTT (E.M.)
Congenital methemoglobinemia due to DPNH-diaphorase deficiency.
in Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism,
Beutler E. Ed., Grune and Stratton, N.Y. 1968
- 349 - SCOTT (E.M.), DUNCAN (I.W.), EKSTRAND (V.)
Reduction of methemoglobin.
Fed. Proc., 1963, 22, 467.
- 350 - SCOTT (E.M.), HOSKINS (B.D.)
Hereditary methemoglobinemia in Alaskan Eskimos and Indians.
Blood, 1958, 13, 795.
- 351 - SCOTT (E.M.), Mc GRAW (J.C.)
Purification and properties of diphosphopyridine nucleotide diaphorase of human erythrocytes.
J. Biol. Chem., 1962, 237, 249.
- 352 - SELWYN (J.G.), DACIE (J.V.)
Autohemolysis and other changes resulting from the incubation in vitro of red cells from patients with congenital haemolytic anemia.
Blood, 1954, 9, 414.
- 353 - SHAHIDI (N.T.), DIAMOND (L.K.)
Enzyme deficiency in erythrocytes in congenital non spherocytic hemolytic anemia.
Pediatrics, 1959, 24, 245-252.
- 354 - SHERMAN (J.R.)
Rapid enzyme assay technique utilizing radioactive substrate, ion-exchange paper, and liquid scintillation counting.
Anal. Biochem., 1963, 5, 548-554.
- 355 - SHERMAN (J.R.), ADLER (J.)
Galactokinase from Escherichia Coli.
J. Biol. chem., 1963, 238, 873-878.
- 356 - SHIH (L.Y.), JUSTICE (P.), HSIA (Y.Y.)
Purification and characterization of genetic variants of 6-phosphogluconate dehydrogenase.
Biochem. Gen., 1968, 1, 359.

- 357 - SJOLIN (S.)
The resistance of red cells in vitro. A study of the osmotic properties, the mechanical resistance and the storage behaviour of red cells of fetuse, children and adults.
Acta Paediatr., 1954, 43, 98.
- 358 - SMITH (J.E.), Mc CANTS (M.)
Partial purification of erythrocyte glucosephosphate isomerase.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 171, 372-373.
- 359 - SPARKES (R.S.), BALUDA (M.C.)
Detection of G.6PD by fluorescence after cellulose acetate electrophoresis.
Anal. Biochem., 1969, 30, 289.
- 360 - SPARKES (R.S.), BAUGHAN (M.A.)
Blood cell pyruvate kinase activity in translocation Down's syndrome.
Humangenetik, 1969, 7, 253.
- 361 - STAAL (G.E.J.), HELLEMAN (P.W.), DE Wael (J.), VEEGER (C.)
Purification and properties of an abnormal glutathione reductase from human erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 185, 63-69.
- 362 - STAAL (G.E.J.), HELLEMAN (P.W.), Van MILLIGEN-BOERSMA (P.W.), VERLOOP (M.C.)
Properties of glutathione reductase purified from erythrocytes with normal and with diminished activity of the enzyme.
Ned. Tijdschr. Geneesk., 1968, 112, 1008.
- 363 - STAAL (G.E.J.), VEEGER (C.)
The reaction mechanism of glutathione reductase from human erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 185, 49-62.
- 364 - STAAL (G.E.J.), VISSER (J.), VEEGER (C.)
Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 185, 39-48.
- 365 - STARWEATHER (W.H.), COUSINEAU (L.), SCHOCH (H.K.), ZARAFONETIS (C.J.)
Alterations of erythrocyte lactate dehydrogenase in man.
Blood, 1965, 26, 63-72
- 366 - SWIERCZEWSKI (E.), GIBELIN (C.)
Glutathion, glutathion-réductase, G.6PD dans le sang de la veine ombilicale et le sang veineux de femme enceinte.
C.R. Acad. Sci. Paris, 1965, 260, 2941.

- 367 - TAKAHARA (S.)
 Acatalasemia in Japan.
 in Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism,
 Beutler E. Ed., Grune and Stratton, N.Y. 1968
- 368 - TAN (I.K.), WHITEHEAD (T.P.)
 Automated fluorometric determination of 6.PGD activities in
 red blood cells.
Clin. Chem., 1969, 15, 467-478.
- 369 - TANAKA (K.R.), BEUTLER (E.)
 Hereditary hemolytic anemia due to G.6PD torrance : a new
 variant.
J. Lab. Clin. Med., 1969, 73, 657-667.
- 370 - TANAKA (K.R.), VALENTINE (W.N.)
 Pyruvate kinase deficiency
 in Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism
 Beutler E., Ed., Grune and Stratton, N.Y. 1968
- 371 - TANAKA (K.R.), VALENTINE (W.N.), MIWA (S.)
 Pyruvate kinase deficiency hereditary non spherocytic hemolytic
 anemia.
Blood, 1962, 19, 267.
- 372 - TARUI (S.), KONO (N.), NASU (T.), NISHIKAWA (M.)
 Enzymatic basis for the coexistence of myopathy and hemolytic
 disease in inherited muscle phosphofructokinase deficiency.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1969, 34, 77.
- 373 - TCHERNIA (G.), NAJEAN (Y.), SCHALSON (G.), BOIVIN (P.), SCIALOM
 (C.), RULLIER (J.), BERNARD (J.)
 Déficit complet en G.6PD associé à une cholémie familiale de
 Gilbert chez un sujet français métropolitain.
Arch. fr. Ped., 1968, 25, 621-637.
- 374 - TEMKINE (H.)
 Le métabolisme glucidique de l'érythrocyte.
 Thèse Med., Paris 1963
- 375 - THALHAMMER (O.), GITZELMANN (R.), PANTLITSCHKO (M.)
 Hypergalactosemia and galactosurie due to galactokinase deficiency
 in a newborn.
Pediatrics, 1968, 42, 441-445.
- 376 - TONZ (O.)
 The congenital methemoglobinemias.
 Karger Ed., Bâle, 1968

- 377 - TOWNES (P.L.), LOVELL (G.R.)
 Hereditary methemoglobinemia : a new variant inhibiting dominant inheritance of methemoglobin A.
Blood, 1961, 18, 18-33.
- 378 - TRAYSER (K.A.), SELIGSON (D.)
 A new kinetic method for enzyme analysis suitable for automation.
Clin. Chem., 1969, 15, 452-459.
- 379 - TRUBOWITZ (S.), KIRMAN (D.)
 The leucocyte alkaline phosphatase in mongolism.
Lancet, 1962, 1, 486.
- 380 - UHLENBRUCK (G.), PARDOE (G.I.)
 Die struktur der Erythrozyten oberfläche.
 in Metabolism and Membrane permeability of Erythrocytes and Thrombocytes
 1st International Symposium, Vienne 1968
- 381 - VALENTINE (W.N.), HSIEH (H.), PAGLIA (D.E.), ANDERSON (H.M.), BAUGHAN (M.A.), JAFFE (E.R.), GARSON (O.M.)
 Hereditary hemolytic anemia associated with phosphoglycerate kinase deficiency in erythrocytes and leucocytes. A probable X-chromosome linked syndrome.
New Engl. J. Med., 1969, 280, 528-534.
- 382 - VALENTINE (W.N.), OSKI (F.A.), PAGLIA (D.E.), BAUGHAN (M.A.), SCHNEIDER (A.S.), NAIMAN (J.L.)
 Hereditary hemolytic anemia with hexokinase deficiency. Role of hexokinase in erythrocyte aging.
New Engl. J. Med., 1967, 276, 1-11.
- 383 - VALENTINE (W.N.), SCHNEIDER (A.S.), BAUGHAN (M.A.), PAGLIA (D.E.), HEINS (H.L.)
 Hereditary hemolytic anemia with triose phosphate isomerase deficiency. Studies in kindreds with coexistent sickle cell trait and erythrocyte G.6PD deficiency.
Amer. J. Med., 1966, 41, 27-41.
- 384 - VALENTINE (W.N.), TANAKA (K.R.), MIWA (S.)
 A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect (pyruvate kinase) in three subjects with congenital non-spherocytic hemolytic anemia.
Trans. Ass. Amer. Physicians, 1961, 74, 100.

- 385 - VERDIER (C.H. de), GARBY (L.)
Low binding of 2,3-diphosphoglycerate to haemoglobin F. A contribution to the knowledge of the binding site and an explanation for the high oxygen affinity of foetal blood.
Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1969, 23, 149-151.
- 386 - VIGNERON (C.), STOLTZ (J.F.), STREIFF (F.)
La résistance globulaire osmotique : données actuelles.
Pharmacien Biol., 1970 (à paraître)
- 387 - VOLPATO (S.), VIGI (V.), CATTAROZI (G.)
Nonspherocytic haemolytic anaemia and severe jaundice in a newborn with partial pyruvate kinase deficiency.
Acta Paediat. Scand., 1968, 57, 59-64.
- 388 - WAITZ (R.), BOIVIN (P.), OBERLING (F.), CASENAVE (J.P.), NORTH (M.L.), MAYER (S.)
Variante Gd (-) "Strasbourg" de la G.6PD.
Nouv. Rev. fr. Hémat., 1970, 10, 312-314.
- 389 - WALKER (P.G.)
Fluorescence assays in clinical enzymology.
VIIe Congrès de Chimie clinique, Genève-Evian, 1969
- 390 - WALLER (H.D.)
Reinigung der Erythrocyten-Glutathion reductase von Gesunden und Patienten mit Glutathion reductase-Mangel.
Klin. Wschr., 1967, 45, 827.
- 391 - WALLER (H.D.), BENOHR (H.C.), WAUMANS (P.)
Zur Entstehung der medikamenteninduzierten Anämie bei glutathionreduktase-mangelträgern.
Klin. Wschr., 1969, 47, 25-30.
- 392 - WALLER (H.D.), BREMER (J.), SCHONTHAL (M.), DOROW (W.)
HbC homozygotic mit glutathion reductase Mangel.
Klin. Wschr., 1967, 45, 824.
- 393 - WALLER (H.D.), LOHR (G.W.)
Hereditary non spherocytic enzymopenic hemolytic anemias with pyruvate kinase and 2,3-diphospho-glycerate mutase deficiency.
IX Cong. Soc. Europ. Hemat., Lisbonne 1963
- 394 - WALLER (H.D.), LOHR (G.W.), TABATABAI (M.)
Hämolyse und Fehlen von G.6PD in roten Blutzellen (Eine Fermentanomalie der Erythrocyten).
Klin. Wschr., 1957, 35, 1022.

- 395 - WALZ (F.G.), CHAN (P.C.)
Effects of cysteine and potassium on the ATP dependent retention of sodium ions by erythrocyte membranes.
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 135, 885.
- 396 - WARBURG (O.)
Wasserstoffübertragende Fermente.
Saenger W., Ed. Berlin, 1948
- 397 - WELLS (W.W.), PITTMAN (.T.A), EGAN (T.J.)
The isolation and identification of galactitol from the urine of patients with galactosemia.
J. Biol. Chem., 1964, 239, 3192-3195.
- 398 - WEST (C.A.), GOMPERTZ (B.D.), HUEHNS (E.R.), KESSEL (I.), ASHBY (J.R.)
Demonstration of an enzyme variant in a case of congenital methaemoglobinaemia.
Brit. Med. J., 1967, 4, 212-214.
- 399 - WHITAKER (J.F.)
A general colorimetric procedure for the estimation of enzymes which are linked to the NADH/NAD⁺ system.
Clin. Chim. Acta, 1969, 24, 23-37.
- 400 - WIEMANN (U.), TONZ (O.)
Investigations of the kinetics of red cell pyruvate kinase in normal individuals and in patient with pyruvate kinase deficiency.
Nature, 1966, 209, 612.
- 401 - WILLE (B.), SCHMIDT (E.), RITTER (H.)
Formal genetics of red cell phosphoglucomutase polymorphism.
Humangenetik, 1969, 8, 67-68.
- 402 - WOOD (T.)
The inhibition of pyruvate kinase by ATP.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1968, 31, 779-785.
- 403 - YOSHIDA (A.)
G.6PD of human erythrocytes. I. Purification and characterization of normal (B+) enzyme.
J. Biol. Chem., 1966, 241, 4966.
- 404 - YOSHIDA (A.)
A single amino-acid substitution (asparagine to aspartic acid) between normal (B+) and the common negro variant (A+) of human G.6PD.
Biochemistry, 1967, 57, 835.

405 - YOSHIDA (A.)

The structure of normal and variant human G.6PD.
in Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism.
Beutler E. Ed., Grune and Stratton, N.Y. 1968

406 - ZAHLER (P.)

The structure of the erythrocyte membrane.
Experientia, 1969, 25, 449-456.

407 - ZINKHAM (W.H.)

Metabolism of glucose by erythrocytes from patients with congenital hemolytic disorders.
J. Pediat., 1962, 60, 614.

408 - ZINKHAM (W.H.), LENHARD (R.E.)

Metabolic abnormalities of erythrocytes from patients with congenital non spherocytic haemolytic anemia.
J. Pediat., 1959, 55, 319.

A CONTRIBUTION TO THE BIOCHEMICAL STUDY OF ERYTHROENZYMOPATHY

C. VIGNERON

--:-

Abstract

Erythrocyte enzymopathology is nowadays recognised as a well defined entity : most impairments are well individualized, clinical consequences are codified, the methods of investigations are defined ; however, the theoretical and practical aspects are not easily dissociated in their exploration.

This work includes two parts :

The first part is composed of 2 chapters. The first one shortly recalls the red cell metabolism whereas the second one, more elaborated, accounts for the present knowledge concerning the properties and the eventual defects of every enzyme.

The second part, including 5 chapters, relates our experience and our investigations.

1 - Research of an enzymopathy

Though some highly specialized laboratories carry out erythrocyte enzymatic study as a routine examination, it still remains a delicate investigation. Attention is drawn on the difficulty of interpretation of the variations of enzymatic activities. One must remain prudent, as the precision in absolute value and the reproductibility of results remain relatively weak (Chapter 1).

2 - Glucose-6-phosphate deshydrogenase defect : Nancy Gd(-) variant

The determination of physico-chemical properties of an enzymatic molecule responsible for a defect in glucose-6-phosphate deshydrogenase in a European subject with chronic non spherocytic hemolytic anemia enabled us to individualise a new variant of the enzyme ; its denomination, according to the nomenclature Commission of the World Health Organisation, is Nancy Gd (-) (Chapter IV-A).

3 - NADH diaphorase defect

The electrophoretic study of NADH depending diaphorase in two sisters with this defect, as well as in their parents, did not allow us to evidence a band of abnormal mobility. Mental debility associated to the defect in one of the patients does not seem to be related to the existence of an abnormal molecular type evidenced by electrophoresis (Chapter IV - B) :

4) Galactokinase

4-1. The new method proposed for the measurement of erythrocyte galactokinase requires the same material, the same hemolysat, the same reagents as those used for the determination of other enzymatic activities. It can be easily included in the investigations, making the laboratory work easier. (chapter II)

4-2. The development of a method for the measurement of the electrophoretic mobility of erythrocyte galactokinase affords a new criterion for the study of the physico-chemical properties of the enzyme. In the conditions used, galactokinase presents only one band of activity in the erythrocytes of the adult or of the cord (chap. II).

4-3. An erythrocyte galactokinase defect in a new-born, similar to the case reported by TALHAMMER and GITZELMANN in 1968, is studied. It differs by its transient and partial character, a particularity which, to our knowledge, has never been described in the literature so far. (chap. IV-C)

5 - Foetal enzymes

Wide variations of enzymatic activities are observed in the cord blood compared to adult-blood. The particular study of glucose-6-phosphate deshydrogenase suggests that the cord enzyme and the adult enzyme differ not only quantitatively, but also qualitatively (chapter III).

6 - Erythrocyte enzymes and chromosome mapping

The measurment of erythrocyte enzymatic activities in patients with caryotype abnormalities is in agreement with an attractive hypothesis. The results obtained, together with the few works recorded until now, suggest that neither chromosome 21 nor chromosome 18 are carriers of structure genes of erythrocyte enzymes (chapter V).

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
Plan	7
A propos du genre du mot enzyme	9
Liste des abréviations	11

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I — Le métabolisme du globule rouge	13
— A — L'incorporation des oses plasmatiques	16
— B — Les voies du catabolisme glucidique	19
— C — Les mécanismes de protection contre l'oxydation	30
— D — Les autres voies métaboliques	33
— E — L'évolution biochimique du globule rouge	34
Chapitre II — Les enzymes du globule rouge	37
— Hexokinase	39
— Phosphohexomutase	47
— Phospho-hexo-isomérase	49
— Phospho-fructo-kinase	53
— Fructose-1,6-diphosphate-aldolase	55
— Triose-phosphate-isomérase	59
— Glycéraldehyde-3-phosphate-deshydrogénase	61
— 2,3-Diphosphoglyceromutase	63
— Phospho-glycérate-kinase	65
— Phospho-glycérate-mutase	67
— Enolase	69
— Pyruvate-kinase	71
— Lactico-déshydrogénase	79
— Glucose-6-phosphate déshydrogénase	81
— 6-Phosphogluconate déshydrogénase	91
— Glutathion synthétase	95
— Glutathion réductase	97
— Glutathion peroxydase	101
— Catalase	103
— NAD (P) H-déshydrogénase	105
— Galactokinase	107
— Galactose-1-phosphate-uridylyltransférase	109
— Adénosine triphosphatase	111

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre I - Exploration des Erythroenzymopathies	115
I - Recherche et Etude d'un déficit	115
II - Bilan enzymatique érythrocytaire	121
Chapitre II - Nouvelles méthodes d'étude de la galactokinase	135
I - Mesure de la galactokinase par une méthode directe	137
II - Mesure de la mobilité électrophorétique de la galactokinase	155
III - Mesure de la consommation du galactose "In vitro"	163
Chapitre III - Activités enzymatiques du sang de cordon. Particularités de la glucose-6-phosphate- deshydrogénase	166
I - Activités enzymatiques du sang de cordon	166
II - Etude particulière de la glucose-6-phosphate désydrégénase	172
Chapitre IV - Etude biochimique de quelques déficits enzymatiques	185
A - Anémie hémolytique chronique par déficit en glucose-6-phosphate déshydrogéné- nase chez un européen. Mise en évidence d'une variante nouvelle de l'enzyme	187
B - Méthémoglobinémie congénitale par déficit en diaphorase NADH - dépendante chez deux sœurs	203
C - Déficit partiel et transitoire en galactokinase érythrocytaire chez un nouveau-né	210
Chapitre V - Enzymes érythrocytaires et aberrations chromosomiques	218
1 - Anomalies des autosomes	221
2 - Anomalies des gonosomes	225
Conclusion	227
Bibliographie	233
Summary	275

UNIVERSITE I DE NANCY

FACULTE DE PHARMACIE

T H E S E

Présentée par Claude VIGNERON
Né le 22 août 1941 à Laxou
Nationalité : Française
et portant le titre :

CONTRIBUTION A L'EXPLORATION BIOCHIMIQUE DES ERYTHROENZYMOPATHIES

Vu

Nancy, le 25 juin 1970
Le Président de Thèse

R. BENE



Vu

Nancy, le 25 juin 1970
Le Doyen de la Faculté

R. BENE

